(19)日本国特許庁 (JP)

識別記号

(12) 公表特許公報(A)

庁内整理番号

ΓĮ

(11)特許出願公表番号 特表平7-503622

第1部門第1区分

(51) Int.Cl.4

(43)公表日 平成7年(1995)4月20日

(02) 2	may 1 hm . 1	VI LITTER A				
C 1 2 P 21/08		9161-4B				
C07K 16/00		8318-4H				
16/18		8318-4H				
16/32		8318-4H				
53, 52		9050 - 4 B	~ 1	2 N 15/00	ZNA A	
			- "			
		番盆睛水	未請求	予偏審查請求	未請求(全 17 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特顧平6-514437		(21)4	2 ESS 1	(A	
			(11)		ウ ケミカル カン	
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)12	月10日		アメリ	力合衆国、ミシガン	48640、ミッ
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)8	月11日		ドラン	/ド, アポット ロー	ド, ダウ セン
(86)国際出願番号	PCT/US93	/12039		ター	2030	•
(87)国際公開番号	WO94/138	0 6	(72)务	明者 メゼス	, ピーター エス.	
(87)国際公開日	平成6年(1994)6	月23日	יכי	アメリ	カ合衆国、コネチカ	ット 06371.
(31)優先権主張番号	990, 263		:á.	オール	ドライム. シル レ	ーン 25
(32)優先日	1992年12月11日		(72) 9		ー、プライアン ビ	
(33)優先権主張国	米国 (US)		26		カ合衆国、ミシガン	
(81)指定国	EP(AT, BE,	CH, DE,		ドラン	ド、オーチャード	ドライブ 3713
DK, ES, FR,	GB, GR, IE,	IT, LU, M	(74) #		: 石田 敬 少43	
C. NL. PT. SI	E), AU, CA, J	P	М.			
			2.5%			
•						
	· .					

ter.

Acre

1000

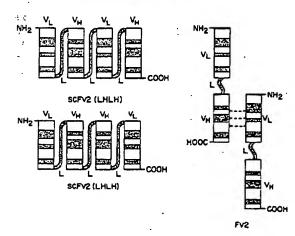
13

(54)【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

(57)【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を 有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖 抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチ ドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体 は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結 されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び針共有結合型一本額Fv多量体の図解



. . .

.55.

浄雪(内容に変更なし)

カボの戦闘

- 1. 2以上の一本領沈体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する観和性を存しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:
 - (a) 値傾可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
 - (b) 重額可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド:及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと 連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎮抗体。

 Γ

を有する、請求項し記載の多価の一本領抗体。

- 3. この軽減可変領域が、図3に示すものと実質的に間じアミノ 酸配列を有しており、そしてこの重頻可変領域が、図5に示すもの と実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項 | 配戦の多価の 一本級抗体。
- 4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸 配列を有する、請求項1配数の多価の一本鎖抗体。
- 5. 多価の一本段抗体をコードする DNA配列であって、この多価の一本段抗体が2以上の一本銀抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:
 - (a) 経験可皮ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

浄都(内容に変更なし)

明相書

多価の一本組抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に応答して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその復合体であり、軽減と重額とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽減は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重類は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽頻及び重頻の間者に由来する、それぞれV。及びVsと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは標々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データーは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフランクされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。この CDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は 2 本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、「IgGクラスは 2 つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体「IgHクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は珍

(b) 重額可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド:及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと 連結せしめる第二のペプチドリンカー:

を含んで成る、 DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実 質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が 図3のそれと実質的に同じである、頭求項5配数の DNA配列。

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体 は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエ ローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的 に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインピガ治療及び診断 にとってのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト 抗-マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合されたものが組換 DNA方法論により作られている。例えば、 Sahagenら、J. [paunol., 137: 1066-1074 (1886): Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 214-218 (1987): Nishimuraら、Cencer Res., 47: 999-1005 (1987);及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、本ズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その裏理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造金体のうちの主要部分を構成するFC 領域を保育し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、係的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体機分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽額及び重額の可変領域であるため、一本のV、と一本のV。とにより一本額抗体フラグメント(scPvs) が作られており、これは6つの CDRを含み、それらはペプチドリンカ

ー(米国特許第 4.846.778号)により連結された $V_{\rm L} - U_{\rm L} - V_{\rm L}$ リペプチドを成しており、ここでしはペプチドリンカーを表している。 $V_{\rm L} \geq V_{\rm R}$ ドメインが配向 $V_{\rm R} - U_{\rm L} - V_{\rm L}$ であるSCPVが米国特許第 5.182.405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べてscFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認 職特性を推持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの損骸 体を獲得することが有利であろう。加えて、標的起離上の別々のエ ピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ペ ース斯増を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体捕獲を可 能とする二価特異的である多価scFvを獲得することが有利であろう。

別の意様において、本発明は2本以上の一本銀抗体フラグメント を含んで成る多価一本銀抗体であり、各フラグメントは抗原に対す る親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチ ドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

(a) 軽額可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド:

図5は CC48V』のアミノ酸配列を示す。

図 6 は p49LHLHにおけるCC49一本鎖抗体LHLHのタクレオチド配列 及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHHLにおけるCC49一本鉄抗体LHHLのヌクレオチド配列 及びアミノ酸配列を示す。

図 8 はプラスミド pSL30IT及びpSL30IHTの構築を示す。

図8はブラスミド p49LHHLの積散を乐す。

図10はプラスミド p49LHLHの構築を示す。

図11はCC491gG、CC49scPv2及びCC49scPvを用いた、競合因子としてピオチニル化 CC491gGを用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の数示全体を引用することで本明細書に組入れる。

複数、アミノ数、ペプチド、保度基、活性基等を略すとき、それらはIUPAC IUB (Commission on Biological Momenclature) 又は関連分野の実際に従って助している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scPv)又は「抗体フラグメント」なる時は、 V_1 ーレー V_2 により扱わされる、ペプチドリンカー(L)により V_2 ドメインに連結された V_3 ドメインを含むポリペプチドを意味する。 V_4 と V_4 ドメインとの関序は逆であってよく、 V_4 ーレー V_5 として表わされるポリペプチドが獲得できうる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原超離を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本類抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した 2 以上の一本類抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

V₁-L-V_n-L-V₁-L-V_n; V₁-L-V_n-L-V_n-L-V₁; V_n-L-V₁-ξ-V_n-L-Y₁; X (±

14 水 1 7 0000022 (0) (b) 重額可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド:及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと 連結せしめる第二ペプチドリンカー:

を含んで成る。

別の取様において、本発明は、多価一本銀抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本銀抗体は2本以上の一本銀抗 体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する超和 性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリン カーにより共有結合しており、そして各フラグメントは;

(a) 軽頻可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

- (b) 重領可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド:及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを概能的な結合性成分へと 連結せしめる第二ペプチドリンカー;

を含んで成る。

この多価一本類抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、 サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗 体フラグメントの構築を可能とする。多価一本類抗体は、結合部位 が2種類の抗原決定差でありうる多価一本類抗体の機能も可能とす るであろう。

図面の簡単な説明

図1は、V:-L-V"-L-V"(LHRL)とV:-L-V"-L-V"(LHRL)の形態を有する共有結合型一本原抗体及び非共有結合型Pv-本原抗体(Fv2)を示す。

図2は CC49V、のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V」のアミノ酸配列を示す。

図4は CC48V。のヌクレオチド配列を示す。

V.-L-V.-L-V.-V.

の V 、と V 。 ドメインの 順序を有する二価の 一本頃抗体を形成してよい。

三価以上の一本頃の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本類抗体に連結されたI又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、V、とV、ドメインの数は等しい。

本発明は、

V_n-l-V_n-l-V_t-l-V_t又はV_t-l-V_t-l-V_n-i-V_nで表示されうる多毎の一本領抗体も提供する。

V₁-L-V_x-L-V₁-L-V_x (LHLH) 及びV₁-L-V_x-L-V_x-L-V_x (LHHL) の形 想を有する共有結合型一本領抗体を図Ⅰに示す。非共有結合型Pv一 本組抗体(Pv2) も図Ⅰに示している。

本発明において利用するための一本頭抗体フラグメントは任意の 抗体の軽額及び/又は重額可変ドメインに由来しうる。好ましくは、 その軽額と重額可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結さ れて多価の一本規抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、 同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して 特異的でありうる。

一本類の多価抗体についての DNA配列を含むベクターを作るため、これらの保域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の保障の手段によって復得できうる。例えば、 The U.S. Department of Health and Human Services により公開された KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版 (1881) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可度領域の配列を開示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNAの起

図として、逆転写酵素仲介合成によりeRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、nRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas、Aperican Type Culture Collection, 20309 Parklam Drive, Rockville Md., USA(1990)を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、モして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できううる。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家書動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫底は課題の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンペットへモシアニン(KLH) の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性抱合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2~3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施されうる。通常、最後の負荷の3日後、膵臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できうるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。
課題の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV、及びV。ドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開された PCT出願 WO 80/04410及び1888年1月26日に公開された PCT出願 WO 89/00692に開示されている、随瘍関連第タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、 PCT公開 WO 90/04410及び WO 89/00682に

おいてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV、及びV*ドメインである。CC48のV、をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1) は図 I に示すものと実質的に同じである。CC48のV、のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2) は図 2 に示すものと実質的に同じである。CC49のV*をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3) は図 3 に示すものと実質的に同じである。CC49のV*をコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4) は図 4 に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、 適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V。とV。ドメ インを連結するための適当なリンカーは、VuとV。ドメインが、 一本領ポリペプチドであって完全抗体のもとの構造に非常に類似す る三次元権済を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している 完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド級へと折りたた まれることを可能にするものである。scPvを連結するための適当な リンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのVx及びV。ドメ インが三次元積造であって、その各フラグメントが、そのイムノグ ロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持 するような三次構造を有するように、2以上のscPvを連結すること の可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内 容を引用することで本明細書に組入れる米国特許第 4,846,778号に 開示の方法により獲得できうる。この第 4,846.778号に記載の方法 により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする 遺伝子配列が獲得できうる。

好ましくは、VnとViドメインを連結してscPvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscPvを連結して多価の一本額抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配剤を有

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その値々の 抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認路部位の結 合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantolianoらのBiochem., 30, 10(17-10125 (1981)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にある Xho I 部位と、他端にあるHind回那位により指定されるコドンを理由に変えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID ND: 5) は下配の塗りである:

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu 。

このリンカーは一般に10~50のアミノ酸残落である。好ましくは、このリンカーは10~30のアミノ酸残器である。より好ましくは、このリンカーは12~30のアミノ酸残器である。最も好ましくは、このリンカーは15~25のアミノ酸残器である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な種に由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での衰現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(E.coli)はpBR322を用いて容易に形質転換される [Bolivarら、Gene, 2, 95-(1877)又はSambrookら、Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Press、New York、第2版(1889))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できうる。S. セレビ ツエ (S. cerevisiae) 又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も 一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアパストリス(Pichia pastoris) が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できる SP2/0 又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できうる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドは pSV2neo及び pSV2gpt (ATCC): pSVL及びpKSV-10 (Pharmacia). pBPV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.) である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及 び真核ウィルス発現ペクターの利用も考慮される。

この免現ベクター及びこの一本級の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つぞの制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrockら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子講案体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本頃ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが審徴することを避けるだめに輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レブリコン及びコントロール配列に加えて、一本頃ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされうる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助品するために必要とされうる(シャペロン)。

市販されているペクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改更されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明 細書における数示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば重利耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、超換 DNA技術を用いて構築されたベクターにより超換的に形質転換されうる細胞である。裏判耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば重判耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養培地の中で整確するこを防ぐうえで利用されうる。この思想において、かかる純粋な形質転換細胞の培養物は生存のために納発された波現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養培地の中に分泌されるなら、この一本級の多低技体は限外處過により機構されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、炊いで限外違過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル違過を実行することにより違成されうる。不存性であり、足つ配折体(refractile bodies)、通称對人体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、対入体を単離するための違心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジンーHCIによる可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本級の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば 競合アッセイ、酵素結合免疫収着アッセイ(ELISA)及びラジオイム ノアッセイ(RIA)により餌定できうる。

IEP 等電点電気泳動 Kbp 中口塩基対

LB Luria-Bertani 培地 Mah モノクローナル抗体

MES 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸

別 分子量

NBT ニトロブルーチトラゾリウムクロリド

オリゴ オリゴヌクレオチド PAG ポリアクリルアミドゲル

PAGE ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PBS リン酸級衝食塩水 PCR ポリメラーゼ連鎖反応

pSCFV SCPVをコードする DNA配列を含むプラスミド

RIGS ラジオイムノガイド外科

RIT ラジオイムノ治療

scFv 一本鎖Pvイムノグロブリンフラグメントモノマー

scPvs 共有結合した一本類Pvイムノグロブリンフラグメントダ イマー

SDS ドデシル硫酸ナトリウム

TBS トリス経衡食塩水

トリス (トリス (ヒドロキシメテル) アミノメタン)

TTBS ツイーン20洗浄液

V。 イムノグロブリン重銀可変ドメインV。 イムノグロブリン軽銀可変ドメイン

抗 体

<u>CC49</u>: ヒト腫瘍間連結タンパク質72(TAG-72) に特異的なネズミ モノクローナル抗体:ATCC No. HB9459として奇託。 本発明の多価の一本領抗体は診断及び治療における利用に固有の 利点を供する。この多価の一本領抗体の利用は、大きめのフラケメ ント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それら はその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排 除される。

诊断及び/又は治療用途のため、この多価の一本額抗体は1又は 複数の抗体フラグメントが課的組織に対して特異的であるように、 及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対し て特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの傷的抗原はしばしば細胞の表層上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本銭抗体は適当なイメージ又は治療剤に当禽界に公知の方法によって抱合されうる。本発明の薬理組成物は当禽界に公知の方法、例えば常用の混合、治解又は凍結乾燥工程によって理事される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により 更に取らかにする。

10 F

BCIP 5-プロモー4-クロロー8-インドイルホスフェート

bp 塩基対

Bis-Trisプロパン (1, 3 - ピス(トリス(ヒドロキシメチル) ーメチルアミノ)プロパン)

BSA 牛血清アルプミン CDR 相類性株定領域

ELISA 酵素結合免疫収着アッセイ Fv2 非共有一本額Pvダイマー

CC49PAB: 重額のN-宋端領域に連結している完全軽額より成る CC49の抗原結合性領域。

CC49scFy:ペプチドリンカーにより連結されているCC48抗体の二本の可数ドメインより成る一本額抗体フラグメント。

CC49Fv2 : ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。Fvの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Fv5は六量体の多量体を意味する。

CC495cFv2: 3 つのリンカーにより連結されている、2 本のCC49VLドメインと2 本のV。ドメインとより成る共有結合型一本額抗体フラグメント。V.(L) とV。(H) ドメインとを連結し合わせるのに6 つの可能な順序の組合せかある: LHLH, LTHL, LLEH, PLLH, HLHL 及びHHLL。

プラスミド

<u>pSCPV UHN</u>: 25のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC48 の可変軽額とCC49可変重額とより成るscPvについてのコード配剤を含むプラスミド。

<u>p49LHLH 又は p49LHHL</u>: CC49scFv2 LHLH又はLHHL生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

実施例

一般英敏

分子クローニングのための手頭は、その朝示内容を引用することで本明細書に組入れる。Sambrookら、 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第2版(1889)及び Ausubelら、Current Prtocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York(1992)に配敵の手頭である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、係準の8-シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、 Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又は Model 381 DNA合成装置のいづれかで合成した。その生成物上の保障基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバボレーションを介して除去し、そしてその粗偽合物を30~40μ1の減固水の中に再懸風させた。ポリアクリルアミドー尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。 DNAバンドをゲルから切り出し、そして1m1の100mM のトリスーHC1、pH 7.4、500mMのNaC1、5mMの足DTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、 DNAを SepーPac(簡優) C~18カラム(Millipore、Bedford、MA)に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶解させることによって行った。その溶液の体質を約50mlに下げ、そして DNA確度を260nm(OD3***)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

割肢酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD). New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BM, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手頭に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、その DNAバンドを短波UV光により強烈化させ、次いでその DNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5 mkのトリス、 2.5mkの酢酸、1 mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ (Union Carbide Corp., Chicago) の中に入れ、そして Max Submarine電気泳動装置(Hoefer Scientific Instruments,

より測定した。 scFv2の結合は、発色の同時低下を伴うピオチェル 化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンプロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20μ1)を、非理元用サンプル回製パッファーSeprasol 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA) の中で5分間救施することにより関製し、そして10-20%勾配のポリアクリルアミド Dailchi Minigelにその製造者の仕様者(ISS) に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2ーゲル装置(ISS) を用い、ゲル当り55mAで、一定の電流で約75分行った。ゲルをクマジーブリリアントブルーRー250 (Bio-Rad. Richmond, CA) の中で少なくとも 1 時間染色し、次いで設色した。分子量標準品は予め染められており (Mid Range kit, Diversified Biolech. Newton Center, NA)、そして下記のタンパク質を含んでいた:ホスホリラーゼも、グルタメートデヒドロゲナーゼ、共成アンヒドラーゼ、オバルブミン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、Bーラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。 電気泳動後、ゲルの一方を陽低パッファー# I (0.3Mのトリスー HCI、pH10.4)の中で15-20分平衡にした。 [amobilon-P.PVDF (ポリ ピニリデンジクロリン) 膜 (Millipore、Bedford、MA) をメタノー ルで2分処理し、そして水の中に2分悪した。その膜を次に陽極パ ッファー# 1 の中で3分平衡にした。 Milliblot-SDE 装置(Millipore) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。 一層の陽極パッファー# 1 を勝極電極面の中央に載せた。 Whatman 3MM 建紙のシートを陽極パッファー# 1 の中に浸し、そしてその電 CA) を用いて溶離させた。サンブル容量を Speed Vac機線器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。 DNAをエタノール沈段させ、そして減壊水の中で再熔解させた。

酵素結合免疫収費アッセイ(ELISA)

Johnsonら、 Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載 の通りに賃貸した TAG-72抗原を、ポリピニルクロリド96穴マイク ロタイタープレート (Dynatech Laboratories, inc., Chaptility, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレー トを PBS中の1%の BSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200μ1 の PBS、0.05%のツイーン50で3回洗った。25±1の試験抗体及び 25 μ 1 のピオチニル化CC49 (1/20,000希釈迦の 1 ng/nlの旅跡) をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュペート した。プレートに結合した『AG-72、ピオチニル化CC49、ストレブ トアピジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余 計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscPvによる競 合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に快定し た。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC48Pab とした。該性コントロールは PBS中の 1 %の BSA及び/又は強LBと した。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼ の抱合された1:1000の希釈率のストレプトアピジン50μ1(Souther Biotechnolgy Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そして そのブレートを31℃で30分インキュベートした。そのブレートを更 に3回洗った。50μlのパラーニトロフェニルーホスフェート溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories. Inc., Gaithersburg, MD) & 加え、そして発色反応を最低20分行わせた。 scFv2結合の相対量を マイクロブレートリーダー (Molecular Devices Corporation. Manlo Park, CA)を用い404 - 450 nmでの光学密度スキャニングに

極節の上に持らかに置いた。陽極パッファー#2 (25mMのトリス、pHi0.4)の中に捜した別の施紙を一枚目の上に載せた。次に適れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に降極パッファー (40mMのグリシン中の25mMのトリスHC1、pH9.4)の中に捜した連紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電流(初期電圧は8~20ポルトに範囲した)を用いて30分で進せられた。

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすずぎ、そして20mlのプロッキング溶液(トリス段表食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を有する皿の中に入れた。TBS はPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0,15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少度 1時間、周囲遺度でプロックし、そして20mlづつの 0.5%のツィーン20洗浄液(TTBB)を用いて5分間3回洗った。TTBBを調製するには、0.5ml のツィーン20(Sigma)を TBSのリッター当り混合した。使用したプローブ抗体は20mlのピオチニル化 FAID 14熔液とした(10μg/20mlの抗体パッファー)。抗体パッファーは 100mlのTTBS当り1gの BSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プローブした後、その順を上配の通りTTBSで3回洗った。

次に、その機を原便温度において30~60分、抗体バッファーの中で1:500 希家率のアルカリホスファターゼの抱合されたストレプトアピジン (Southern Biotechnology Associates. Birmingham. AL) 20mlとインキュペートした。洗浄工程を上配の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、漢を炭酸アルカリバッファー (20ml)の中で2分洗った。このバッファーは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMの MgCl₂・H₂O、pH9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

8

ての基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT) クロリド (50mg、Sigma) を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。 5 ープロモー4ークロロー3ーインドイルホスフェート (BCIP)(25mg、Sigma)を別に 160%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。 5 ープロモー4ークロロー3ーインドイルホスフェート (BCIP)(25mg、Sigma)を別に 100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、 Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ 120gーを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色調からそれらを水で洗い流した。ピオチニル化 FAID 14

FAID 14は、CC4Bに対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄 託されているネズミの抗ーイディオタイプ抗体(igG2a、Kアイソタ イブ) である。 FAID 14を Nygene Protein Aアフィニティーカラ ム(Yonkers、NY) を用いて精製した。製造者のプロトコールに従っ たが、ただし溶粒パッファーとして 0.1Mのクエン助ナトリウム、 pH 3.0を用いた。画分を 1.0MのトリスーHCl pH 9.0を用いてpH~ 7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。FAID 14 (1 mg、水の中で 100 µ 1) を 100 µ 1 の 0.1 M の Na 2 CO 2, pH 9.6 と混合した。ビオチニルーeーアミノーカプロン酸N-ヒドロキシ スクシニミドエステル (Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA) (2.5mg) を 0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。 Biolin-X-NHS 溶液(20μ1)を FAID 14溶液に加え、そして22 でで4時間反応させた。過剰のビオチン及び不能物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム (Piscataway, NJ) を用いてゲル波染 により除去した。 0.8μ l /min の流速で、ビオチニル化 FAID 14 は 18.8minのピークで出現した。このピークを構成する面分をプー ルし、そして4℃で保存し、そして CC48V』及び VaCDRにより決定

これらの値は、D.B.Watlaufer, Advances in Protein Chemistry. 17色、 375~378 質に記載されている情報に基づいている。 高性能粧体クロマトグラフィー

CC49scPv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン製配管を用いた LKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定された UV CORD ST 2238 型検出装置および2211型 SuperRac fraction collectorで構成されている。

サブユニットの PCRによる製造

ポリメラーゼ連級反応(PCR) はすべて、 150ピコグラム (pg) のプラスミド係的 (pSCFVUHH) : 100ピコモルのプライマー:] μ I のPerkin-Elmer-Cetus社 (米国、コネティカット州、ノーウォーク所在の PEC社) の Ampli-Tagポリノラーゼ: 16μ L の 10m dNTP および 10μ L の $10\times$ 緩衝液 (両者ともに PECキットに提供されている): ならびに合計容積を 100μ L にするのに充分な水で構成された反応混合物で行った。 PCR反応はメーカーが配載しているのとほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー (thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、84℃で20~45秒間の DNAの変性: 52~60℃で 0.5~ 1.5分間のアニーリングおよび72℃で 0.5~ 2.0分間の仲長で様成されている。オリゴタクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社 (米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在) の380A製 もしくは 391 型 DNA合成群で合成し次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

100ngのベクター DNAおよび対応する1:1 化学量論的当量のインサート DNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国。

されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR(Madison、NI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータープログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸组成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。 Cys残益は電荷に寄与するため、 Cysについての計数は 0 に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にplを、Isogelアガロース IEPプレート、pH域 3 ~10(FMC Bioproducts. Rockland、NB)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルモ、『EFを行うのに用い、両者の製造者の仕様音に従った。電気泳動条件は、 500ポルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。専電点泳動は 90minで完了した。 IEP 標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、βーラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトへモグロビンA及びC、3 レンチルレクチン及びチトクロームCを含み、それとのpl値は4:65,5.10,6.00,6.50,7.00,7.10及び7.50,7.80,8.00並びに8.20及び9.60である。ゲルを、FMCにより供給された仕様者に従って染色及び脱色した。CC48杭体権の定量

IgG, scPv2の複および単量体scPvを含む前裂CC48抗体はすべて、 適合している 1.0cm光路長の石类製キュペット(Helina社)および Parkin-Elmer UV/VLS 分光光度計552A型を用いて、タンパク質帯 駅液の 280mm放長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数 (E.) は、各抗体について、下配式を用いて創定した。

E = = (Trp数) ×5.500 + (Tyr数) ×1.340 + ((Cys) 2 数) ×150 + (Phe数) ×10

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、酸メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容観20μL)は最初18℃でインキュペートし、次いで一夜 4 ℃まで徐々に冷却した。

形質転換

形質転換は、 100μ L のS tratagene社の大腸肉(E. coli) AG 1 コンピテント細胞(米国。カリフォルニア州。ラ・ホーヤ所在のS tratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA($1 \sim 5 \mu$ L) を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアプロス(LB)中で37 でで1時間再生させ、続いて、 pSCPVUHN, p49LHLHもしくは p49LHHに用いる 20μ g / nLの 20μ nLの 20μ g / nLの 20μ nL

大陽菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、 Promega社 (米国、ウィスコンシン州。マディソン所在)の Magicミニーブレッププラスミド製造キットを用いて、海太圧 (selection pressure) を推荐するため適切な蓋剤を含有するLBプロス培養物から単載した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

プラスミドの構築

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

 $p49LHHLを含有する宿主知路は、<math>V_L-L-V_R-L-V_R-L-V_L$ で表すことができるポリペプチドを産生した。こゝで V_L と V_R はCC49抗体の軽額と重額の可変領域であり、およびしは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC49V_-L-V_{*}-L-V_{*}-L-V_{*}(p49LHLH)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6) とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7) を図6に示す。CC49V_{*}-L-V_{*}-L-V_{*}-L-V_{*}-L-V_{*}-L-V_{*}-L-V_{*}(p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8) およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9) を図7に示す。

pSL301HTの積数

PSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)のペニシリナーゼP (penP) ターミネーターの配列を、Nhe I およびBamk I で45分配消化することによって、pSCFV UHMと合名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後4.5%ポリアクリルアミドゲルから切取り、電気泳動を行った後4.5%ポリアクリルアミドゲルから切取り、電気泳動を行った後4.5%ポリアクリルアミドゲルから切取り、電気泳動を行った後4.5%ポリアクリルアミドゲルから切取り、電気泳動を行ったカールで沈豫させ、次に、同様に製造されたベクター:pSL301 (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCFV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出願の米国特許期第07/935.695 号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に提用するものである。一般に、pSCFV UHMは、penPプロモーターのアクレオチド配列:固有Nco I 制限部位:CC49V、領域:Hind II 制限部位:25個のアミノ動のリンカー:固有 Xho I 制限部位:CC49V、領域:Nhe I 制限部位:penPターミネーター;およびBamH I 制限部位を含有している(図8 参照)。このpenPプロモーターとpenPターミネーターは、Vezesら、J. Biol. Chem.、258券、

SCP5:5'-TAMA <u>CCT ACC</u> ACCA <u>ACC GCT</u> TAG TCA CCA CAC GCT GAC TCA CCT-8' 下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅された VaDNAを、4 %の PAG、 電気熔出、エタノールによる 比酸および20 μ L 水への溶解によって精製した。その Va 配列を Xho I と Nhe I の制限酵素で育化し、同じ制限酵素で消化され続い で精製された pSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。 保障のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4 μ L)を用いて コンピテント大器菌AG I 細胞を形質転換させた。形質転換された細 腔を、 1B AMP100寒天プレート上にプレートした。 CC49Va インサートを含有していることを示す機構的クローンを Nhe I およびXho I 液化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB) 社 (米国、オハイオ州クリープランド所在) のSequence Kit、および配列決定用プライマー pSL301SEQB (pSL301ベクター中、 Xho I 部位から57bp上流において アニールした21bpの配列決定プライマー) と CC49VHPを用いて、DNA の配列決定を行って、 CC49V。の配列を確認し、pSL301HT中に正しい CC48V。配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301ーHHLTおよびpSL301ーHLHTの両者を構築するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをこゝに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12) および CC49V。(SEQ ID NO: 13) のオリゴテクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-8' CC49VHP: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-8'

実施例 1 p49LHHLの積築

pSL301HT(5 μg)を出発物質として用い、これを Eco47回および Nhe I で消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。 CC49Va 挿入フラグメントは、5 ′ オリゴとして SCPGCを用いかつ 11211~11218 頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3 μ L)を、LB-AMP100寒天 プレート上にプレートし次いで一夜増殖させたコンピテント大脇菌 AG! 細胞を形質転換するのに用いた。penPターミネーター、インサ ートを含有するポテンシャルクローンを、 Pharmacia社 (米国、メ リーランド州、ガイサーズパーグ所在)の T7 Quickprime **P DNA 標珠キットと、Bulumelsら、 Nucleic Acid Research、17巻、 452 夏、1989年に記載されているマイクロ旅によるコロニー溶解法をと もに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-Nhe I - BanH I ターミネーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによ って提供された指示によって製造し使用した。陽性ブローブであり、 かつBanHIおよび Nhe Iによる消化物由来の 207個の塩基対挿入断 片 (図 6 に示す1958~2165の塩基対 (bp))を含有するクローンを pSL301T と命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有 するpSL301HTを得築するのに選択した。 Whe I - BamH I penPターミ ネーターをpSL301中に配置した理由は、その Nhe I とBamH I の部位 の間のポリリンカー領域中に存在する Ecc47回制限エンドヌクレア ーゼ部位を除くためであった。このことは、 Eco47回部位が、構造 体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要があるV。 とV.n の領域を続いて構築するため設計された。各V領域がEco47頁 - Nhe I 郎位に付加されると、 Eco47回は各場合に破壊されて、ニ ニーク挿入断片に入ってくる次の Eco47頁都位を形成した。

V. 配列は、PCR増幅の標的として pSCFV UHUを用い、オリゴの5′SCP1と3′オリゴSCP5によって PCRで作製した。SCP1に対するDNA 配列(SEQ ID NO:10) とSCP5に対する DNA配列(SEQ ID NO:11)は次のとおりである。

SOP1:5' -TAMA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

8′ オリゴとしてSCP5を用い、 PCRによって製造した。 SCP6Bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO:14) は下記のとおりである。

SCPBB: 5' -TAMA <u>TOC GCA</u> GAT GAC GCA ANG AMA GAC GCA GCT AMA AMA GAC GAT
GCC AMA AMG GAT GAC GCC AMG AMA GAT CTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG
TCT-G'

またオリゴ SCPGBはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO:14のbp8~76) を含有している。 pSCFV UHW中のCC49VH便的でアニールするよう設計された数オリゴの部分は、 SEQ ID NO:14中のbb77~80由来のものである。

下線をつけた配列は Psp I 部位に相当する。得られた PCRインサートを精製し、「Fsp I と Nhe I で商化し次いでpSL301HT Eco47回ーNhe I ベクターとのリゲーション反応に用いた(図 7)。ロンピテント大器書AG I 細胞を、このリゲーション反応物(3 μ L)で形質転換を行うのに用い、LB - AMP100素天プレート上にプレートした。pSL301HHT 生成物を示す正しい大きさの Xho I ー Nhe I インサートを有する 2 個のクローンの配列をオリゴ SQP1を用いて決定し、正しい配列(図 7 のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SQP1のヌクレオチド配列(SEQ 1D NO:16) は下配のとおりである。

SQP1 : 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-9'

最終のリンカーV: サブユニット (bp1544~1863、図7) は、5′ オリゴの SCP7bと3′オリゴの SCP8aを用いかつ PCRの標的として pSCPV UHMを用いて製造した。 SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ 1D NO:17) は下記のとおりである。

SOP75 : 5' -TAM $\underline{\text{TOC GCA}}$ GAT GAC GCA AMG AMA GAC GCA GCT AMA AMA GAC GAT GCC AMA AMA GAT GAT GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CC:

下棟をつけたヌクレオチドは Fsp I 部位である。 SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO:18) は下記のとおりである。

SCP8B: 5' -TAMA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC CAG CTT CGT CCC-3'

下線をつけた最初の一組は Nhe I 部位に相当し、もう一つの組は Afi II 部位に相当する。 SCP70のヌクレオチド8~76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1544~1612)、一方V。にアニールするヌクレオチド77~98は図7の1613~1635に相当する。 プライマー SCP8aは、その5′末端の短かいテール、 Nhe I 制限部位、終止コドン、 Afi II 制限部位およびV。の最後の21億の塩基を含有している。 Fsp I と Nhe I による消化の後、この得られた 420bpのインサートを精製して情製pSt30HHTベクターの Khe I と Eco47 II の部位に連結し、候補的なクローンを Nhe I と Xho I でスクリーニングし、近しい大きさのインサートが確認されかつ49LFR2(一)とSQPIで配列が決定されて、pSL301HHLT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO:19) は下記のとおりである。48LFR2(一):5′-CTG CTG CTA CCA GGC CAA G-3′

と欠失があるということを示した。図 6 にみられるヌクレオチド $1538 \sim 1537$ に相当する 5 個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド 1531 は DNA配列のデータから確認したところ実際にはG であった。得られた配列は、

5' …GAAGCGCTT…であった。

こらで下線をつけた配列は偶然に Eco47 II 部位を形成した。図 6 の AGCCCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539 および 1540 に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴ SCP6C の末端に 5 塩基の欠失を組込むことにによってpSL301 HLHTを製造した。

SCPEC: 5' -TAAGCGCTGATGATGATGCTAAGAAGGACGCCGGCAAAAAA
GGACGACGCAAAAAAAGATGATGCAAAAAAAGGATCTGG
AGGTTCAGTTGAGCAGTCTGAC-3'

SCP6C中の下線をつけた配列は Eco47車部位に相当する。 PCRにおいて、 SCP6Cは 5 ' オリゴとして用いられ一方 SCP10は 3 ' オリゴとして用いられて、リンカー CC48V、セグメントが生成する。
SCP10 のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23) は下配のとおりである。
SCP10:5'-TTG IGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA

CTG AGG TT-3 '

SCP10中の下線をつけた配列は図 8 の 9 クレオチド1958~1963に見られる Nha I 部位に相当する。この場合、 PCRインサートはNha I だけで消化され次いで精製される。ベクター(pSLS01HLT) は 8 になっないで特製される。ベクター(pSLS01HLT) は 8 にないで特製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3 μ L)を使ってコンピテント イー・コリAG! 細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで検討的クローンを Xho I と Nha I でスクリーニングした。正しい大きさ

ド配列を含有している。

実施例2: `p48LHLHの構築

p49LHLHの構築を図11に図式的に示す。リンカーV、のサブユニットを5'オリゴの SCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9 : 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC

AGC ACC AGC TTG GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8~76)は図 6 のリンカーをコード し(ヌクレオチド1124~1192に相当する)および図 6 の V 、のヌクレオチド1193~1215に相当する、 PCRに対する pSCFV UHU概的(ヌクレオチド77~98)にアニールした。

SCP9は、Nhe I 部位(第一の下線をつけたタクレオチド)と Eco47 型部位(第二の下線を付けたタクレオチド)を有し、これらの部位は次のV 領域を受けるための pSL301HLTを作るのに必要な制度部位である。SCP6のタクレオチド18~23は図 8 のタクレオチド 1532~1537(リンカーの最初の 2 個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方 タクレオチド24~46は、 PCRにおける SCP9のアニーリング領域である図 8 に示すタクレオチド1508~1531に相当する。ブラスミド pSL301HTを Eco47 型と Nhe I で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精壓して、予め Fsp I と Nhe I で処理され精製された、 PCRからのリンカーーCC49V。 DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3 μ L)を用いて大器画AG 1 コンを連結させる。その連結混合物(3 μ L)を用いて大器画AG 1 コンラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PENPTSEQ2を用いて決定した。そのタクレオチド配列 (SEQ 1D NO: 21) は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL301HTクローン中に PCRの誤まり

の DNAを有する 3 個のクローンを得た。これらのクローンのうちの 2 個は、オリゴ46VLCDR3 (+) および SQPIを用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列 $(49 \text{VLCDR3}\ (+)$ の DWQ 1D NO: 24) は下記のとおりである。

49VLCDR3 (+) : 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図 6 のヌク レオチド1533~1963からの配列が確認され、正しいpSL301HLHLクロ ーンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを製造するために、pSL301HLHT(5 μ g)を Nhe I と Xho I で 簡化し、次いで V_* -L- V_* -L- V_* -L- V_* -E列 を 合有する小さい方のインサートを積製した。この断片を、pSCPY UHN(5 μ g)を Xho I と Nhe I で 簡化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上配連結混合物の一部(4 μ L)を使ってコンピテント大腸菌AG I 細胞を形質転換した。 得られた形質転換混合物をLB-CAN20 プレート上にプレートし、次いで p49LHLHに対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)および TAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

実施例3 CC48 scFv2のLHLHとLHHLが共有結合した二量体の特製 CC48の共有結合した一本領二量体(scFv2) の特製を行うために、大暴国のペリプラズマ細胞質の回分を、 p49LHLHと f49LHHLの両者の 1.0Lの一夜培養物から開製した。要約すると、培養物を 250ml づつの 4 部分に分割し、Sorval1 CS-3 ロータで10分間 5000rpaで速心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、 30ml NaC1を含有する10mlトリスーHC1 pH 7.3からなる 100ml中に再配割させた。細胞を再びペレット化し、合針 100mlの30mlトリスーHC1 pH 3 で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v %

のスクロースを含有する30mMトリス-RC1 pH 7.3(100mL) および10 mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を部加した。得られた混合物を、時々環境しながら、食温に10分間保持した。高級性細胞(hypertonic cell)を前配のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの水冷 0.5mM MgC1・中に速やかに融高させ、次いで時々環境しながら水上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の割分を含有する上澄み液を、 0.2μmの Nalge社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の建過装置で達過することによってさらに清澄にし、次いでAnicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentrippp 30およびCentricon 30で 1.0mLより小さい容骸まで濃縮した。

p49LHLHまたは p49LHHLのクローン由来の護縮周辺細胞質のショケート (shocka(e) を、 Fharmacia社 (米国、ニュージャージー州,ピスカタウエイ所在) の Superdex 75 HR 10/30 HPLC カラム (予め PBSで平衡化させたもの) に注入した。競合 ELISA法で測定する場合、問題の生成物は 0.5ml/分の統量で21~24分間放出させた。活性圏分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社) を用い、緩衝液を3~4回変えなから8000Mアカットオフ膝を使用して、20mMトリスーHC1 pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料を Pharmacia社のMono Q HR 5 / 5 アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリスーHC1 pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20MトリスーHC1 pH 7.6+0.5M NaC1 を用いる勾配プログラムを、 1.5ml/minの液量で使用した。問題の生成物は、競合 ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の画分の、二つのSDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシープリリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウエスタン分析(ブローブ抗体としてピオチニル化 FAID 14を使用)に移されたが、scPv2(CHLHi またはLEHL) の種の計算分子量の単一パンドが、58.239ダルトンの位置に出現した。活性圏分は各場合機解し、50mM MES pH 5.8に対して一夜遺析し、次いで Pharmacia社のMono S HR 5 / 5 カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの配分の5 と6 は、SDS-PAG 法および ELISA法で測定する場合、勾配核の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの国分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで医分5 と6 はさらに結撃するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S圏分について再度使用したが使用した 緩衝液は20mMトリス〜HC1 pH 8.0であり、流量は 0.8mL/分に低下 させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分配かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定の ために貯蔵した。

等電点電気泳動

構築物の等電点 (pl) は DNASTAR社 (米国, ウィスコンシン州, マディソン所在) のコンピュータブログラム Protein-titrateを使用して予測した。アミノ酸組成、Warおよびpl値に基づいて計算した。

試験では、plu、FMC Bioproducts社(米国、メーン州、ロックランド所在)のIsogel IEFプレートpH配別3~10を使用して選定した。上記 IEFを操作するために、Biorad社(米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在)の電気泳動袋屋を、上記阿メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20gAで 500V(限定)および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は80分間で完了した。Biorad社の IEF標準品は、フィコシアニン、8ラクトグロ

ブリンB、ウシカルポニックアンヒドラーゼ、ヒトカルポニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3程のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、p1値はそれぞれ4、65、5、10、6、00、5、50、7、00、7、50、7、8、8、00、8、20 および 8、6であった。ゲルは FMCの指示にしたがって染色し脱色した。 DNASTAR プログラムによって両方の scFv2の種のp1値として 8、1の 位が予測された。 純品の生成物に対し単一の均一なパンドがゲル上に、両者のp1値の 8、9の位置にみとめられた。

IgC、scPv2 (LHLHおよびLRHL) のような精製CC49抗体は、 280nm 放長光の吸光度を分光光学的に測定することによって定量した。モル吸光保敵値Ex は各々、先に引用した Wetlawfcrの式を用いて測 定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、 CC49igG、 CC49scFv2LHLH、 CC49 scFv2LHHLおよびCC49scFvのE *・'* (280nm)値はそれぞれ 1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

実施例 4

CC49scFv2の積のLHLHとLHHLの相対活性を、 1gGおよびCOOH末端 にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合(percent competition) を下記式によって BLISA のデータから求めた。

ゼロ競合-駐斡院取り値 (OD 405-450nm) × 100

ゼロ競合-100%競合

"ゼロ競合(zero competition)"値は、1% BSAをピオチニル化 CC49($3\times10\sim14$ モル)と1:1 比率で混合して測定し、一方 100 %競合値はピオチニル化 CC49[gGと混合した CC49[gGの5 μ g/ π L 試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は 405nm~ 450nmで測定した。3 図の読取り値の平均値を使

用した。最初に試料(25μ L)を、 TAG-72でコートしたマイクロリットルブレートに、 1.0×10.10 モルの結合部位/ にで達布した。ビオチニル化CC49(4μ g $/ \mu$ L 1:20,000に希釈、 25μ L 使用)で試料を 1/2 換度に希釈した。連続希釈法(1:2)を行った。両方の形態の scFv2は lgGには、等しい(図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体を Fabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全 lgGについてみられるのと周じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、 scFv2分子が、その CC491gCの観と同様に、免疫治療用途の機構であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布裏性動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存の [gG分子に比べて、本発明の化合性は多数医注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍:組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施意様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施保は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

THE STATE OF STREET AND STREET

FIGURE 1

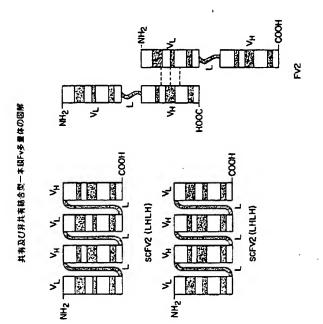


FIG. 2

GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA
GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC
CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC
CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG
GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTC
AAG

FIG. 3

Asp lie Val Het Ser Cin Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Clu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gin Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Cin Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Cly Cin Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Cly Val Pro Asp Arg Phe Thr Cly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gin Cin Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

FIG. 4

GAG	CTT	CAG	TTG	CAG	CAG	TCT	GAC	GCT	CAG	TTG	GTG	AAA	CCT
CCC	GCT	TCA	CTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	CCC	TAC	ACC
TTC	ACT	GAC	CAT	CCA	ATT	CAC	TCG	GTG	AAA	CAG	AAC	CCT	GAA
CAG	CCC	CTC	GAA	TCO	ATT	GGA	TAT	TTT	TCT	ccc	GGA	AAT	CAT
GAT	117	**	TAC	AAT	CAG	ACC	TIC	AAG	ccc	AAG	CCC	ACA	CTG
ACT	GCA	CAC		TCC	TCC	ACC	ACT	GCC	TAC	CTC	CAG	CTÇ	AAC
ACC	CTG	ACA	TCT	CAG	GAT	TCT	GCA	CTC	TAT	TTC	TGT	ACA	AGA
TCC	CTG	AAT	ATG	GCC	TAC	TCO	CCT	CAA	CCA	ACC	TCA	GTC	ACC
GTC	TCC	TCA											

静事(内容に変更なし) FIGURE 6

CC49 M-L-VIH-L-VL-L-VHOOWARUアミノ酸配列

19 5 238 2 3 GAC TAC ATT 1 10 M 35 £8 24 848 848 13 85 25 ř SP Ħ 10 TAC 55 65 50 65 32 55 Ser 858 FT O'-C TEA TOT TTG ACA GGT TAT CAT CGA TGA ATT CCA TEA GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA ACG AGG TCA TCA TTT CCT TET TAE ATA TAT AAT ACT TIC AAA 5 114 55 100 3E AAC A 193 88 Het. A L 255 AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT : TGT TTG AGT CGG CTG AAA GAT 415 53 400 145 CLA I ECOR I GCT TAT CAT COA TGA ATT 125 PERPRI- AAC ACT GO I TCA AGC CAT AAC ACT GO R ACG ATC CAA ATA TO PERPRE- TAT A 128 LYS Pro Thr Val Gly Glu I 25 Met Ala A Ser 115 H 35 10°F RSE 12 E FX. 25 120 36 E GAT 22 42 53 25 ACG GTT GCA 1 TGT AAG ATT 1 C&T 75 P 48 35 53 EE 110 400 Ser 21.0 100 35 \$P

FIG. 5

Clu Val Gin Leu Gin Gin Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Sis Ala Ile Sis Trp Val Lys Gin Asn Pro Glu Gin Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

FIG 6B	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Lau lle Tyr Trp TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG 526	Alm Ser Alm Arg Glu Ser Gly Vel Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT GGC TCC ACA GGC AGT GGA	80 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Sar Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp TCT GGG ACA GAT TTC ACT GTC ATC AGG AGT GTG AAG ACT GAA GAC 622	90 Leu Ala Val Tyr Cys Gin Gin Tyr Tyr Ser Tyr. Pro Leu Thr Phe CTG GCA GIT TAT TAG TGT GAG CAG TAT TAT AGC TAT CGC CTC AGG TTC 670	Gly Ala Gly Thr Lys Lau Val Lau Lys Lau Sar Ala Asp Asp Ala Lys GGT GGG AGG AAG GTG GTG AAG CTT AGT GGG GAC GAT GGG AAA 718	Lys	ט ט ט ט	Xho I 140	Asp Law Glu Val Gla Lew Gla Gla Ser Asp Ala Glu Lew Val Lys Pro GAC CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG CCT GAC TTG GTG AAA CCT 814 160 Cdy Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	GCT TEA GTG ANG ATT TEC TGC ANG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT 862 170 180 Am Ile His Trp Val Lys Glm Asm Pro Giu Gin Gly Leu Glu CAT GGA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA 910	190 CC49VHP- GAY GAT TIT AAA TAC AAT GAG 11e GLY TYF Phe Ser Pro GLY ASA Asa Asa Pro GLY 10 CC4 TY TY TY ASA GAY TYPE COT ASA GAY TYPE ASA GLY	ALL COR IN THE COLUMN AND UNITED AND THE CAN AND UNITED BY SOL SOL THE THE AND LYS SOF SOF THE TOO AND GCC ACT 1006	220 Tyr Val Gin Leu Aan Ser Leu Thr Ser Olu Aap Sor Ala Val Tyr TAC GTG CAG CTC ACA CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT 105%
FIG. 6D	240 WH494- G AAT ATG GCC TAC TGG Thr Arg Ser Leu Asn Met Alm Fyr Trp ACA AGA TGC GTG AAT ATG GCC.TAC TGG	250 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala GTC ACC GTC TCC TCA GTA AGG GAT GAG GCA AAG AAA GAG GCA GCT 1150	LYS LYS ASP ASP ANA LYS LYS ASP ANA LYS LYS ASP Leu ASP INe AAA AAA GAC GAT GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTI GAC ATT 1198	290 Val Met Ser Gin Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys GIG AIG ICA CAG ICE TCC ICC CIA CCT GIG ICA GTT GGC GAG AAG 1246	300 Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Cin Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn GIT ACT 1TG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT . 1294	320 Gin Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ser Pro Gaa aag aac tac tig gcc tgg tac cag cag aaa cca ggg cag tct cct 1342	FIG. 6E	330 Lys Leu Lau lle Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Wal Pro Asp AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCG GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT 1390	360 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser 11e Ser GC TC ACZ GCC ACZ GCA TCZ GCG ACZ ACZ GCG ACZ GCG ACZ GCG ACZ	JYD GIV ASP Leu Ale Val Tyr Tyr Cys Gin Act Gad Gac CIG Gca GIT fat TAC IGI CAG	Sed Thr Phe Gly CTC ACG TTC GGT	Alm Asp Asp Alm Lys Lys Asp alm Alm Lys Lys Asp Asp Alm GCT GAT GAT GCT AAG AAG GAC GCC GCA AAA AAG GAC GCA GCA	Lys Amp And Lys Lys Amp Leu Giu Yai Gin Leu Gin Gin Ser Amp And Car Lys And And Car Crd Cad Crr Cad Tro Cad Crr Cad Tro Cad Crr Crc Crc Crr Crc Crc Crr Crc Crc Crr Crc Crc

١.
_
Ć,
K
K
24
ķΦ
K
Ξ

FIGURE 7

CC49 VL--VH-L-VH-L-VLのDNA及びアミノ酸配列

100	3	ATT	TA	AGA	100	Les	1 00	E 43
CIR I POOR I TTG ACA GCT TAT CGA TGA ATT CCA TGA CTT CCC TCC	3	TAC	3	GAA	35	Lea	Ser	10 20 Ser Euu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Gys Lys For firs for for and ear eas and ser des and ear eas and east and early series and early seri
Ę	10	GAC	TAC	919	A66 TCC	110	250	200
101	ij		¥00	ATA ATA	GTT AGG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CGG AGG PENPRZ- TAT AAG TTT GCC TCC	-22 Wet Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA	Neo I VL Leu ala ala Gln Pro ala Met ala Asp Ile Val Met Ser Cln CTC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCG ATT GTG ATG TCA CAG	35
5	GIT CAT TTG TCC CCG GTG GAA ACG AGG TCA TCT TTT	ACG GIT GCA TIT AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT ITC AAA	AAA GAT CGT	PENPRI- AAC ACT GTA GGG ATA AFC ACT GTA GGG ATA	¥E	A. Cot	Met	8
HI H	104	ACT	CAT	GTA	E4	A18	Val	1
ស្តីស្ត	TCA	M	¥¥	ACT	ATA	Ala	###	Lys
- 85 - 105	AGG	TAT	510	AAC	CAA	400	AP CAS	010
3	ACC	ATA	AGT CGG CTG	CAT	PEN	25	414	20
TAT	GAA	TAC	AGT	ACC	ATC	Leu	ATC	Val.
GCT	cre	15	116	IC.	ACG	CTA	¥ 4 5	Ser
ACA	9	¥	101	161	CTT	F	ដូវ	Val
2	100	H	TCA	GAT	CAT CTG	53	55	25
101	1	ŞÇ	ATT	52	CAT	Yet ATG	4 8	35
2	CAT	611	TOT AAG ATT TGA TGT	111	ste err	ATT TTG	A14 604	Ser
ပု	E	Š	101	110	510	114	35	Ser

334

382

93

F1G. 7B

¥7.8	526	57.4	622	670	118	166
0 # 10 0 # 10 0 # 10	55	664 664	A39	Phe	120 Lys	Ly 3
31	TYT	Ser	SE SE	ACC	450 600 600	LY3
177	#E	5 700	ACT	1. 0.00	ASP	A100
ASG	150 CTG	Thr	25	ဥ္သ	25	AT.
Lys	15 CTC	# 5T	4.0 CTG	171 171	A14 600	439
SIS CAR	Lys	A 00	Ser	Ser	AGT	Lys
	S L	ASP	Ser	77	Hind III TO Lys Leu Ser Ala 1 G AAG CTT AGT GCG (AAG A
GIY	Ser	25	ATC	77	KING KAN	100 E
Ser	Gin	Val GTC	38 J	GLD	200	Asp Ale Lys GAC GCT AAG
77	55	268	250		4.1 676	425
158 1458	P7.0	Ser TCT	žţ.		525	191
SE CTT	Lys	GI _V	E P		AKG AKG	531
Ser	CAG	S F S	ASP	TYT	ţ	400
250	Gin	Ala	FS	Va.1	59	#55 555
Ser	TXC	Ser	617 666	848	AT SCT	GAT
Ser TCC	11 00 00	Ala	101		95	MG.

FIG. 6F

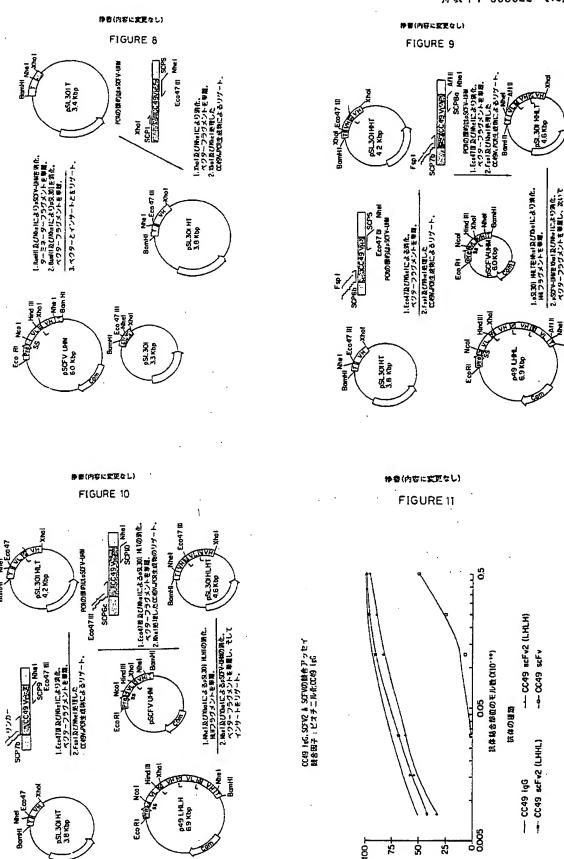
1726	1774	1822	1870	1918	1966
Asa	ASP	Ala	Ser	520 Tyr TAC	CAT
CKG	ASH	ACT	404	Ale	T BGC
LYS	617 664 664	2010	CTC	Met	65 65 64
Val CTC	500	ACA	Ser	Asn	*
455	Ser	A 200	Aan AAC	35	74.
HI3 CAC	Phe	AAG	15 CT	Ser	Ser
ATA TA	TAT	017	CAG	AOA	530
Ala GCA	GGA	Lys	Val	E S	Val
KIS	ATT.	73.80 77.00	Tyr	107	F CO
ASP	172	A SOA	Ala	ž.	Val
F to	GIG	GAG	Act	577	3er TCA
TT C	Lec	Asn	Ser	VAL	45
ξŠ	260 614 667	174	Ser	A1s GCA	657
TYC	รูช	Ly3	Ser TCC	Ser	CES
61 y	GAA	541	490 Ly3 AAA	Asp GAT	617
Ser	555	Asp	ASP	Gla	155

46 94 142 190 238

F16. 66

2062	2110	2158	2165
E	ACC	ATT	
ATC	8	₹	
101	4	GAC	
H	S	101	
116		GAT	
Ħ		116	
៦		999	
99	¥	AAT	
101	999	ပ္ပ	
166	¥	TAG	
3	¥	1CA	
ဗ္ဗ		AAA	
CTC		25	
TT4	CAT	110	-3
ATC		E	Bamy I
CAI	₹	ၓၟ	4 50 4 50 4 50 4 50 5 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6
	PCT ATC TTT	ATC ATT GTC CGC CAA TGG TGT GGG CTT TIT TIG TTT TCT ATC TTT GAT CAT GTG AAA AAC GGG AAA ATC GGT CTG GGG GAA AGG ACC	ATC ATT GTC CGG CAA TGG TGT GGG CTT TIT TIG ITT TCT ATC TTT GG CAT CAT GGT CAG GGG GAA AGG ACC TTT TTG TCG AAA ACC GGG AAA ATC GGT CTG CGG GAA AGG ACC ATT GGG TIG GAT TGT GAC AAA ATT TTG TCG AAA TCA TAG GCG AAT GGG TIG GAT TGT GAC AAA ATT

	81.	298	910	958	9001	1054	1102			•	•		æ	~	0	e q	•	
	o - -	L P4	2 ⊀	טנטם						1150	1198		1294	1342	1390	1438	1.86	
	Lys Pro AAA CCT	Phe Thr TTC ACT	Leu Glu CTG GAA	AAT GAG Aan Glu Aat GAG	Ser Thr AGC ACT	VAL TYY GTG TAT	Thr Ser ACC TCA			Ala Ala GCA GCT	VH 280 Glu Vel GAG GTT	Ser Vel TCA GTG	A18 116 GCA ATT	GOA TAT	Lys Oly AAG GGC	741 Gln 610 CAG	Thr Are	
	150 Vel	ACC	61. 66.	TAC	100	Ala GCA	614 664			A A B A B	35	45	CETS	AT:	£ 2	17	Phe Cys 110 161	
	u Leu	y Tyr	o Gla	1 444 1 443 1 443	A JCC	T TCT	T CAA T GIN			260 Lys Lys Asp AAG AAA GAC	Lys Asp Ala gat		Thr Asp ACT GAC	GIN Tre	340 Glu Arg GAG AGG	Thr Ala Act GCC	Tyr Phe	
	Ala Glu GCT GAG	Ser G1y TCT G0C	700 GIU CCT GAA	GAT TIT Asp Phe GAT TIT	ASP LYS	Glu Asp GAG GAT	166 661 Trp 61y 166 661			Ale Ly GCA AL	Lys C		FF TT A	Leu CTG	138 33 1AT 62	Ser 10	401 T	
22	ASP	At GCT	Ash	A B A T	AL SCA	101	377		70	Asa	48	290 781 676	10	200	23	100	845	
F1G. 7C	n Ser C TCT	S Lys	4 G19 A CAG	CC19THP-	ACT ACT	ACA ACA	210 ATG GCC Met Ala ATG GCC		F16.	Ala Asp GCA GAT	Asp Asp Gat Gac	Glu Leu GAG TTG	61y Tyr GGC TAC	320 Glu Glu GAA CAG		Lys Ser AAA TCC	Asp Se	
Ī.	Gla Gla CAG CAG	3er Cys 1CC TGC	Vel Lys GTG AAA	7.0 GG 10 GG	Thr Les	Ser Leu AGC CTG	4554		ш.	S S	LY3	25	Ser	83	Asp	A59 GAC	Thr Ser Glu Asp Ser ACA TCT GAG GAT 1CT	
	Leu 116	#F	55	190 36r	48	Leu Asn	Arg Ser Leu AgA TCC CTG			Ser Leu TCA CTA	270 Ale Lys GCC AAA	Ser Asp TCT GAC	Lys Ala	Oln Asn CAG AAC		350 Thr Als ACT GGA	Thr Se	
	140 Val Gln GTT CAG	Val Lys GTG AAG	Ile His ATT CAC	Tyr Phe		220 Gln Leu CAG CTC	WHA9				GAT	55	54.8	Lys	664	100	35	
	24 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	Ser 42 TCA GI	A18 604 A1	01y T		Val 22 GTG CJ	Thr An			250 Thr Val ACC GTC	Lys Asp AAA GAC		11. Ser ATT TCC	frp Vel		Ala Thr	Asn Ser AAC AGC	
	CTC CTC	Ala	HIS CAT	911	ž£	Tyr	553			Vel T	Lys		52			Lys	25	
	Asp	3 8	ASP	45	AGG	Ala	Phe											
	1534	1582	1630	1678	1726	1778	1822				1870	1918	1966	2014	2062	2158	Ĉ.	
	100 100	GAT	Oln CAG	AGC 25	A AAG AAC TAC 49LFR2(-)- G	STA C	617				S ACT	520 C CTC	C GAT	4 GCT	TT 0	A ATT		
	390 Thr Val Acc GTC	Lys Asp Aaa gac	Het Ser ATG TCA	Thr Leu Act 116	AG AAC	#70 Leu Leu C10 C10	Phe Thr TIC ACA		:		TG AAG	Tyr Pro	Whe I GCT AGC	GAT CAA CTA GTT	TCT ATC OAA AGO	GAC AAA		•
	401 33 510 AC 133	12 × 12 × 12 × 12 × 12 × 12 × 12 × 12 ×	VAL H	Tan Gri	CAA L	153 170	A 00				Ser Val	Ser	AAA	GGT CGA	# 280	101		
	TCA	S C	A11.20	Lys	F AAT	25	Asp GAT	•			6 8 8 9 5 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5 6 5	r Tyr T TAT	G TAA	A CTT T GAA	T TT0	G CAT		
1.1	61y Thr	ASP ALE	VL Leu Asp CTT GAC	617 61v 66c 640	450 3er 01y AGT GGT	460 Tyr din din Lys Pro diy Gin Ser Tac cag cad aaa cca ggg cag tct atg gtc gtc	12 75			ш	Ser 11e	11 Ty	152	TC AGE	11 21 21 22	00 TT		
F1G. 7E	55	ES.	ASP	14 TE	F F	900	P 000			F1G. 7F	CTC	CAG	Val 1 OTO	ATA TAT TAT	999	AAT		
FIG	6 614	A AAG	S Lys	301 704	T TTA	\$ 4 4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	480 A 1CT			F	Thr	r Cys	a Leu G CTO	T TAC	C CC0	900 0		
	13r Trp 61y 1AC TGG GGT	Asp Ala GAC GCA	Ala Lys GCC AAG	Myo Val CCT GTG	75 55 57	SAG AA	A76 61		`		Asp PP GAT TI	510 1yr 1y 1A1 11	15. 10.	ICA TO AGT AG ENPTSE	24 44	ICA TA		
	A. A. B.	CAT	ASP	15 CTA	Gln Ser CAG AGC	222 232	A19				120	Va1 GTT	200	45	746	444	•	
	380 1 Aft	AT ALE	ASP IG GAT	100 100 100 100	S AGT	757 741 741 741 741	480 Als Sor Ala Arg Glu Sor Gly Val Pro GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT				11 GG	80 A14	ly Ala	GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG SQP1- TGT AGI AGA ATG TAT TTC PENPTSEQ2- G TAT TTC	17 GTC 17 GTG	TTG TCG AAA TCA TAG GCG AAT GGG TTG	י	
	380 Leu Aan Met Ale 1 CTG AAT ATG GCC 1	Leu Ser CTA AGC	410 Lys Lys AAA AAG	Pro Ser CCA TCC	Lys Ser AAG TCC	Ala Trp GCC TGG CGG ACC	4 00 T			Ş	GIY Ser GIY Thr Asp Phe Thr Leu Ser GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC	510 10 Asp Leu Alm Val Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Ty Aa Gac Gto Gca Gtt iat iac Tot Cag Cag Iai Ta 530	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Acc TTC GGT GGT GGG ACC AAG CTO GTG	TCC 6:	CAT ATC ATT GTC CGG CAA TGG TGT GGG GTT TTT AAA GAT CAT GTG ÀAG AAA AAC GGG AAA ATG GGT	111 TTG		
	100	30T	A16	101	165	A P T C C C C C C C C C C C C C C C C C C	177				AOT	GAA	ACG	GAA TCC	CAT	Banff I	3	



平台註

1,5 2-4,6

3,6

من ومن مستحد من جان بعثمانی مستحد منز ؟ ان مشتخره باز وند اظهر و من بن جن جن جند بسام د بن ومرحمه رسن به طرحه من

27-64-1994

Cupido, M

THE S CIENTS/15 COTKIS/20 CIZNIS/62 ASIK39/395

According to benefit and Part General According to the Second department on the PC S. FELDY SANDELD SA

MO.A.91 19739 (CELLTECH LIMITED) 26 December 1991 see.example 1

CANCER RESEARCH
vol. 52, no. 12 , 15 June 1992 ,
PRILADELPRIA, PA, USA
papes 3402 - 3408
1. YORATA ET AL. "Repid tumour penetration
of a single-mchair for and compartsor with
other immunoglobulin forms"
see page 3403, calumn 1, paragraph 4

C. DOCUMENTS CONSCIBLED TO SE RALEYANT

COMMENT | CHARGE OF GROWING WIS SERVICE. WHEN SHAPE

hing address of the St.A.

Surgean Frame Office, P.ds. St.18 Forestices 3

93. - 1300 Self Reports

70. (+ 11-10-) Sen. Steat, Ty., S) diff upo als,
Fam (= 10-7Q, 340-2014.

平成8年 9 月 1 日

特許庁長官 高 島 章 設

1. 事件の表示

PCT/US93/12039

2 発明の名称

多価の一本磁抗体

1 補正をする者

事件との関係

特許出類人

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区成ノ門一丁目8番10号 静光成ノ門ビル 青和特許法律事務所 電路 3504-0721 2000日

氏名 弁理士(7751)石 田 健

5. 精正命令の日付

自発排正

6. 補正の対象

(1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文

(2) 図面の観飲文

(3) 委任状

7. 補正の内容

(1) 明細書、請求の範囲及び契約書の翻訳文の序書(内容に変更なし)

(2) 図面の前訳文の浄書 (内容に変更なし)

(3) 別紙の通り



	国 原 茜 老 報 告	PCT/US 93/12039
	DOCUMENTS COM DISMIN TO ME LITTLE VANT	
	Company of the company and distributed in the state of the company	Edward or steam (vs.
*	SIDEMPISTRY vol 10 to 42 . 22 October 1991 , EASTON, PA US pages 1017 - 10125 N.W.PANTOLIAND ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Py immunoplobulin fragments expersed in Excharichia coli' clad in the application sap page 10100, column 1, paregraph 2	2,4
t	EP.A.O 506 124 (TANOX BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 6	. 1,6
P,X	WO.A.93 11161 (ENZOH, INC.) 10 June 1993 see figure 19A	1,8-6
- 1		
.		
- 1		
- 1		
- 1		
	•	
ļ		
ı		1
		1

Part Recommended Part Part Part		国際調査	報告		93/12039
WO-A-9119739 26-12-91 AU-A- 7982191 O7-01-92	Court Statement	~	Promition members	7	
Al-A- 1299292 15-10-92 JP-A- 5117164 14-05-93	WO-A-9119739	26-12-91	AU-A- EP-A-	7983191 0488632 2250993	27-01-92 24-04-82
KO-A-9311161 10-06-93 AU-A- 3178993 28-05-93	EP-A-0506124	30-09-92	AU-A-	1299292	15-10-92
	VD-A-9311161	10-04-93	AU-A-	2178993	28-05-93

page 2 of 2

フロントページの続き

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載 【部門区分】第1部門第1区分 【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年诵号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08 C07K 16/00 16/18 16/32 16/46 C12N 15/09 ZNA //(C12P 21/08 C12R 1:19 [FI] C12P 21/08 9358-4B C07K 16/00 9356-4H 16/18 9356-4H 16/32 9356-4H 16/46 9356-4H

手無糖正去

ZNA A 9282-4B

平成9年 7月2日

特許庁長官 龙 井 書 光 野

C12N 15/00

1. 単件の表示

平成6年特許政策511437号

2 項正をする者

事件との関係

特許追願人

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

作道 〒105 東京都港区虎ノ門芸丁目5巻1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 電鉄 03-5470-1930

氏名 弁理士(7751)石 止

4. 捕走对象多数名

明板會及び請求の範囲

5. 核正対象項目名

明飾者及び請求の範囲

6. 施正の内容

(1) 明母者を別途の話り招正します。

(2) 輪求の範囲を別紙の通り額正します。

7、 旅付書館の当録

(1) 明和 1

1.7

(2) 約束の範囲

上発明は一本紙の名を抗体に関する。

多価の一本鉄気は

杭体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に応否して免疫系 により悩竜されたイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。ミクラスの と、抗体があり、各クラスは同一の基本精査を育している。抗体の基本構造は四 **緑体、又はその複合体であり、軽額と重額とよりそれぞれが構成される二つの刷** 一のヘテロダイマーより攻る。赵袞は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重領は一本の可要性ドメインと、3本以上の定 常ドメインとより成る。延續及び重鎖の両者に由来する、それぞれVL及びV。 と称される可能ドメインは、イムノグロブリンの特別性を決定し、他方、定常(C.) ドメインは権々なエフェクク・機能をもたらす。

アミノ鉄配列データーは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存され たフレームワーク領域(FR)によりフランクされている3つの相関性決定領域(C DR)を含んて成ることを示験する。この経は可変領域ドメインの健造係合体を経 抱するものと考えられている。この CDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要 であり、登つ抗体の結合の多様性の原因であると概定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。 何えば、『46クラスは2つの日 の技原的合部位を育しており、他方、五量体 [gliケラスは'0を同一の結合部位を有している。

間一の雑伝系列及び結合特異性を有するモノクロードル抗体は診断及び治療剤 の両方として有限とされている。モノクローナル抗体は、耳立された手順に従い 、マウスのリンパはと新当なマウスミエローで観覧系との融合により作っれたハ イブリドーマにより日常的に度白される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ 治療及び診断にとってのネズミ院体の投与は、ヒト免疫系により顕発されるヒト **ゼーマウス抗体力器に基づき制約されている。**

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可収収収が別の種に出

果する次体の之後では、1. Tabunol. 1.37: 1085 1074 (1989): Sano. Proc. Ratl. Arzel. Sci. 7.54、82: 214-218 (1987): Rishland G. Cancer Kos. 近: 989 - 1005 (1987): 及び Lieb. Proc. Ratl. Arzel. Sci. 7.54、82: 214-218 (1987): Rishland G. Cancer Kos. 近: 989 - 1005 (1987): 及び Lieb. Proc. Ratl. Arzel. Sci. 7.54、81: 3139-2443 (1987): を参照のこと。これらは健緩開達抗原に対するキメラ気体を研究している。典型的には、中央主義体の可要循環はヒト気体の定定循環に連続されている。かかるキメラ抗体にその起放において大部分がヒトであるため、それらはネズミ技体よりも免疫度性が実質的に低いるのと予測される。

キメラ状なは、次点は合にとって必須でないが、その裏型動力学に影響をみば すタンパク異体を企体のうちの主要部分を承載する取扱減を集合し続けている。 免疫患品又は免疫診断における抗体の利用のため、素的組織に出速に集中し、且 つ結合する式体体分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に静除され ることが感望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を 対しており、そして完全性はよりも身体からより至く物欲される。

地限と地互作用するのは就数及び電換の可変模様であるため、一本のV。と一本のV。とにより一本動技がフラグメント(serve) が作られており、これは6 で α CBS を含み、それらはペプテドリンカー(全国特許素 4.846,7789)により連結されたV。- L V。まりペプチドを成しており、ここでLはペプテドリンカー・毛嚢している。V。とV。ドメインが反向V。- L · V。であるacPvが公民特許 5.132,405号に得済されている。

完全前件にとっての最少限の2つの統合第位と述べてs:Fvは、つのそれを分するため、seFvは2辺上の結合部位を含む抗体に比べてない活性を有している。

従って、このボリベブチドの所性を高めるため、見つその抗原の森野性を取扱 又は高めるため、特殊の結合部位を有する。よいの特定はを得得することが有利で あろう。加えて、便的組織上の別々のエピトープの危性を可認とする、別の免役 ニフェクター機能の抗体ベース所理を可能とする、又は治療もしくは治断収合の 抗体抗復を可能とすることが有利である多値とはYを維持することが有利であろう

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本のVx と一本のV

国際の単位の記載

図(は、 V₂ -1-V₃ -1-V₃ -1-V₃ -1-V₄ (LEE)) と V₂ -1-V₃ -1-V₃ (LEE)の 影感を有する共有結合型一本種式体及び非共有結合型Py-本語媒体(Pr2)を示す

森 2 は CC49V。(SEQ 10 MO: 1) のヌクレオチド紀列を示す。

53 ct CCASVL (SEQ IL NO: 2) のアミノ酸配列を示す。

bit4は CC49V。(SEO II NO: 3) のメクレオチド配列を示す。

図5は CCASV_n (SEQ It NO: 4) のアミノ鉄配列を示す。

時6は p40LBLE(520 lb Ho: 6) におけるCC40―本鉄抗体LULHのスクレオチド 配列をびても7時配列を示す。

| 両7 ti p49LBHL(SEQ IF NO: B) におけるCC49―広館抗体LOHのスクレオテド | 医列及びアミノ酸配列を示す。

図Bはプラスミド pSLSO(T及びpSL3019Tの精器を示す。

内8はブラスミド pigLEBLの情気を示す。

図10はプラスミド p49LKLMの構築を示す。

関ロはCOSDIgC、CCSSsePv2及びCC49seFvを用いた、数合図子としてピオテエル化、COSPIgCを用いる統合アッセイの結果を示す。

本明知書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明知書に起入れる

複数、アミノ放、ベフチド、保護基、活性基礎を貼すさき、それらに(EAX 10 8 (Commission on Elologica) Someoclature) 又は制造分析の実際に使って終している。

本明知書で行いる「一本独派体クラグメント」(asが)又は「抗体フラグメント」なる語は、V。 こ V。により扱わされる、ペプチドリンカー(L)により V。ドメインに連続されたV。ドメインを合むポリペプチドを意味する。V。と V。ドメインとの順序は遊であってよく、V。 L - V。としてあわされるポリペプチドが収得できるる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗敏域企業は抗災の進入な代謝を及ばすシンパク質のセグメントである。

「多価一本鉄統体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本観飲

。ドメインとを有する一本館ははつラグメントは、第二ペプチドリンカーによってたれ続合されて、完全的はの結合機和力を結合している手値。不知的はを形成できうることが発見された。一般体において、本処別は技能に対する動和性を有する条件、本館状体であり、ここでこの多面・木顔技体は2本以上の軽熱可要ドメインとを含んで成り、ここで各可交ドメインは少なくとももう一つの刻の可能ドメインに連続されている。

別の無検において、本発明は2本以上の一本軸は体ソラグメントを含んで乗る 多番一本観式体であり、各フラグメントは広葉に対する機能性を得しており、こ こでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより大有慈音しており、そ してなフラグメントは:

- (a) 斡旋可変ドメインを含んで収る第一ポリペプチド:
- (b) 重額可変ドメインを含んで取る第二ポリペプサド:及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的収益合住成分へと連続せ<mark>しのる</mark> 第二ペプチドリンカー:

をなんである。

別の整構において、本発供は、多曲一木樹ははをコードする EMA原列を発生し、ここでこの多価の一本植物は作2 不以上の一木樹ははフラグメントを含んで成り、名フラグメントは抗量に対する影神性を行しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして8フラグメントは、

- (a) 移動可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド:
- (b) 重額可要ドメインを含んで成る軍ニボリペプチド:及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを政体的な結合性成分へと連結なしめる 第二ペプラミリンカー:

を含んで成る。

この多属一本競技体は、充全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より記点な乗音通過を可能とする抗体フラグメントの情報を可能とする。 変化である。 変価一本競技体は、缺点無効が多種類の抗菌状定量でありうる多質一 本観点体の構造も可能とするであろう。

体フラグメントを意味する。この流体フラグメントは連絡されて、

 $v_{L} = (1 + v_{R} + L + v_{L} + L + v_{R}) + (v_{L} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{L}) + (v_{R} + L + v_{L} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R}) + (v_{R} + L + v_{R} + v_{R} + L + v_{R} + L + v_{R} + v_{R} + L + v_{R} +$

Ve -1-Va -1-Va -Va

の $V_{\rm L}$ と $V_{\rm R}$ ドメインの順於も有する二個の一本機技体を形成してよい。

三国以上の一本顔の多価技术は、通知のペプチド間リンカーによって二面の一本頭点体に連絡された!又は数本の抗体フラグメントを育する。 好通な型機においては、V. とVn ドメインの材は等しい。

本角羽は、

** -L-Va -L-V, -L-V, 又は **: -L-Va -L-Va -L-Va

で表示されうる多価の一本額抗体も提供する。

 Y_1 L. Y_1 -L- Y_2 (LOLE) 及び Y_2 L. Y_3 -L- Y_4 -L- Y_4 (LOLE) のが好を存する共有結合型 : 木能領集を図1に示す。非共有結合型 Y_1 - 木橋県体 Y_2 (SOLE 示している。

本島初において利用するための一本別がはフラグメントは任日の法体の総議及 び/又は直鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その最初と重視可定ドメ インは同一の抗原に特異的である。過ごされて多価の一本統領体を構成している 低々の技体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々 か成果に対して希異的でありうる。

一本観の多径的体についての DAN配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする適位子の起動が必要とされる。適当な DAN配列に立れの起駅から入手するか、又は当業界に公知の標準の手指によって獲得できる。 例えば、 Tae U.S. Department of Wealth and Human Servicesにより公開された Raban らのSequences of Froteins of Immunological Interest 第4度 (1991) は、今日まで述べられているほとんどの技体可変組織の配列を原系している。

進伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする TRAの転載として、速 転写学家仲介合成によりmeRiから復得したCDMA配列を利用することが一般に可能 である。試体に関して、meRiAの記典に広範囲にわたるハイフリドーマから使得で きうる。例えば、カクロダATCC Call Lines and Hybridomas. American Type Co iture Callection、2000 Parkless Drive、Rockville Md. USA(1990)を参照のこと、その中に挙げられている幅出い様々な技能と反応性のモノクローナル技体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、モして小発門において利用である。これらの種類系及びその他の類似の種類が、可能ドメインをコードするmtMの配数として、又はモノクコーナル技体と体のアミノ酸阻利を決定するために抗体タンパク気を重視するように利用できううる。

複製の技術が基準でき、そしてそのアミノ熱の異だけを知り得たら、その配列 本連続事件もことが可能である。

本発明において有層なり、及びり。ドメインは好ましくは、1920年3月3日に 公明された PCTH版 90 86/04(10 及び1989年1月26日に公開された PCTH版 90 88/09592 に関係されている。技術制造権ナンパク質で2万項に対する一選のCC 仮びの一つから復得できる。こり分ましいのは、アビ公園 70 90/04(10 及び 90 89/03592 においてCC49とカ示されているモノクローナル状体に出来するV、及びV。ドメインである。CC49のV、をコードするアクレオチド配列(SSQ 11 Mill 11) は四2 にボナものと実質的に同じできる。CC49のV、のフトノ設配列(SSQ 10 Mill 2) は四3 にボナものと実質的に同じできる。CC49のV。をコードするアクレオチド配列(SSQ 10 Mill 3) は四4に示すものと実質的に同じである。CC49のV。をコードするアミノを配列(SSQ 10 Mill 4) は四5に示すものと実質的に同じである。CC49のV。をコードするアミノを配列(SSQ 10 Mill 4) は四5に示すものと実質的に同じである。CC49のV。をコードするアミノを配列(SSQ 10 Mill 4) は四5に示すものと実質的に同じである。

本発明の枕体フラグメント及び多種の一本様式体を形成するため、過当なペプ チドリンカーを得ることが必要である。Vx と V 、ドメインを連絡するための基 当なりンカーは、V。とV、ドメインが、一本日本ドペプチドであって完全気体のもとの構造に非常に値影する三次元候益を育し、従ってその核化フラブメントが由来している法令数体の場合料理性を得待しているはリペプデド数へとかりたたされることを可能にするものである。scFyを適待すられたのの道台なりンカーは、全イムノグロブリンフラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している実象が体の結合特異性を存続するような三次構造を育するように、2月上のおFyを連接することの可能なものである。系数の特色を育するリンカーは、その對応力変を引用することで本期担害に収入れる未開特許等、4.5代、TRGに開示の方法により機構できうる。この形式、946、TRGに開示の方法により機構できうる。この形式、946、TRGに認故の方法により作されたボリペプチド配列より、ポリペプチドモニードする遺伝子配列が接着できる。

好ましくは、Vale とVi ドメインを連結してsefvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のsefvを連結して多額の一本種気体を形象せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じてより数配列を割する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その値々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗験感染解位の結合性力を妨害しないように や加されていることも必要である。

行道なリンカーは、PattelianoものBlochez、20. C117 - 10125(1991) に関 示されている2050と称されているヘリカルリンカーを基础とするが、その最初と 最後のアミノ酸は、一種にある Ciol 的位と、他時にあるBio(画部堂により選定 されるコドンを理由に収えられている。

好遊なリンカーのアミノ世配列(SEQ 13 NO: 5) は下記の違りである:

Les Ser Ala-Asp-Asr-Ala-Lya Lya Asp Ala Ala Lya Lya-Asp-Asp-Ala-hya Ly x-Asp-Asp-Ala-Lya-Lya-Lya-Asp-Les .

このリンカーは一般に10~50のアミノ耐疾等である。好ましくは、このリンカーは10~30のアミノ耐疾基である。より好をしくは、このリンカーは12~30のアミノ無疾基である。毎も好ましくは、このリンカーは15~35のアミノ無疾基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはブラスミド又はその他のベクターが

きまれる。小駅に、かかるベクターは街主報数と適合性が選に事業するレプリコンとコントコールを知らせ合む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質を設施組め中での食気型圏別を供することのできる発定の違な子を保存している。例えば、大場理(f.coii)はpRR222を用いてお母に形質経験される(Relivar G. Gene, 2. 95-(1977)又はSaxbrookも、Molecular Cloubuz, Culd Spring Earbor Pross, Rev Tork 観光版 (1889) 1.

真領和基にとって適当なプラスミドも利用できらる。S、セレビジス(S. cere visite)又は一般のパン解目が高便報生転の中で最も一条的に利用されているが、数多くのその他の体、例えばビジア・パストリス(Pichia postoris) が有用である。必確認生物、例えばACCより入手できる SP2/0 又はチャイニーズハムス ソー部無に成まする制力の格養的も治主として利用できらる。 有象動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミミは pSY2aco及び pSY2gpt(ATCC): pSY1及びpX551-0 (Pharmacia)、pDPY-1/pNI2d (International Biotechnolosy、Iz c.) である。

木福明でポリペプチドについての遺伝子を充決するための顕微及び真微りィル ス発家ペクターの利用も寺屋される。

この発表ペクター及びこの一本館の多価数体をコードするインサートは、その 挿入連絡器において適合性制限部位で有し、当つその制限悪位が作人の無駄にとって固有であることが好きしい。ペクター及びインサートの両者とも制限エンド タクレアーゼにより執責し、次いで任意の様々な方法、別えばSambrockら、両便に記載の方法によりもヴィンチで。

本祭児の一本領の多価技体の製造にとって計画なべクターの適位予備熱体は、 構成的に記載な程序プロモ・ター、新生一本使用リベブチドの合成。/ 制数の外へ の分泌を誘導するシグテルペプテドをエンロードする可収を含むらのである。 好 ましくは、その発質値度は、不溶性物質としてそのボリベブチドが審理すること を退けるために構造、折りたたみ及び構成過程とつり合う。 レブリコン及びコントロール配列に加えて、 一本選ポリペプチドの最適な合成にとって過度の要素が 必要ときわうる。これもの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び軟件シグナルが含まれる。更に、追加の適位了及びその 中域物が収成及び折りたたみを設置するために必要とされうる(シャベロン)。 可数されているベクターはベクターにとって上記の基準を進かすように関係に 改度されうる。かかる改変は入手できる首約及び本明確実における数字により、 治薬者によって容易に実施される。

更に、このフローニングペクターは選択マーカー、例えば遅漸耐性マーカー、 又は宿主網路による選別できる行政の発度を引き起こすその他のドーカーを含む ことが好ましい。「宿主網出」とは、経典 UNA技術を用いて構造されたベクター により組換的に影質を受されらる船地である。 要析の低又はその他の選択マーカー はお野紅夢の運動をある提供助仗することを思知する。 更に、選択マーカー、 例えば葉飛前柱マーカーの存在は、突然微生をが始重な地の中で繋配することで、 でうえて利用さたうる。この無疑において、かかる終昇な形質に参加地の特要物 は年年のために換係された複類型を必要とする条件のもとで超越を結集すること により取られるであるう。

本発明の回収及び得顧は当業界に公和の静原は係を利用して地域されっる。例 えば、おしそれるが協業情域の中に分泌されるなら、この一本類の多価は体は個 外線通により表稿されらる。そのボリベブチドが電子構造のベリブラズで立関へ と輸送されるなら、相似はその相似に促送圧ショックを与え、次いて限外に適い 抗電アフィニティークロマトグラフィー又はイオン及浪グロマトグラフィーを用 いるカラムクロマトグラフィー及びゲル産組を実行することにより速域されらら 。不能性であり、且つ部所体(refractile badies)、差勢対人体として存在して いるボリベブチドは、関節の指揮、対人体を単則するための成心と沈浄の盛り返 し、例えばグアニジン一般」による可体化、及び事度の新りたたみ、それに載く 生物活性分子の物製によって得製できうる。

一木単の多磁気体の高性は当販児に公用の標準アッセイ、例えば融合アッマイ 、資素結合免疫収替アッセイ(ELISA) 皮びラジオイムノアッセイ(RIA) により急 足であるる。

本発明の多価の一本個抗体は診断及び治療における利用に関すの利点を供する。この多価の一本個広体の利用は、大き的のフラグメントスは抗体分子全体の利用に勝る数素くの利益を係する。それらはその標的細胞により迅速に到達し、そ

して身体からより迅速に群撃される。

参析及び/又は治療用途のため、この多額の一本語は体は1又は複数の妨碍フラグメントが傾的根柢に対して格異的であるように、及び/又は複数の妨碍プラグメントが診断もしくは指数四子に対して特異的であるように動義されうる。

本為別は更に、第の知るの際者の診断及び/又は治療において有用な時に持能 たな基準値並わら売しており、ここでこの場例加票はしばしば知識の表産上で 毎期される。物断及び/又は治療用途のため、このを毎の「本籍に体は連当なイ メージ又は治療剤に当業界に分加の方法によって知合されする。本際明の基礎理 成功は当業界に公知の方法、例えば常常の現合、冷器又は凍納が満工程によって 類似される。

本発明を、その単なる例示も意図する下記の実施例の考慮により更に切らかに する。

昭 语

86:7 5ープロモーモークコロー3ーインドイルホスフェート

60 百百列

flia-Trisプロパン (1)。3 ーピス(トリス(ヒドロキシメテル)ーメチルアミ

ノ) プロパン)

884 牛血清アルブミン

SLISA 酵素糖合物症収着アッセイ

3v2 起共有一本献Pvダイマー

18F 安電点電気泳動

Ibo 辛口塩基对

LD Luria Bertes! 用地

Nab モノクローナル抗体

BES 2 - (N-モルホリノ) エクンスルホン酸

好 分子量

XBI ニトロブルーテトラゾリウムクロリド

オリブ オリゴメクレオチド

プラスミド

<u>pSCFV UIDU</u>: 25のアミノ散リンカーにより返替されている。CC49の可能を値と CC43可能生的とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

<u>Midnin R は prolim: CC695cPy7 LHL3</u>XにUHL4点的のそれぞれを主張するためのコード配列を含むプラスミド。

美花例

一、投票局

分子クローニングのための手座は、その制示内容を引用することで本明報書に 超入れる。Sarbreobら、 Molecular Clouing, Cold Spring Earber Press, Jew Tork部2版 (1889) 及び Ausebaiら、Carrent Priocols in Molecular Biology, John Miley and Sons, Jew York (1992) に配慮の手段である。

ここで用いた水は全て脱イオン富留水とした。

オリゴスクレオラドの合成及び消費

よりゴタクレオテド(オリマ)は全て、根準のカージアノエチルボミホウミジット及び自成カウスを用い、Applied Biosystams (Foster City, CA) 由来の自由 1850A又は Model 391 BixAe成を置のいづれかでも成した。その生成物上の系数基は、液水酸化アンモニウムの中で55℃でも「15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバボレーションを介して協立し、そしてその程度が物を30~40 μ 1 の減固水の中に再発度させた。ボリアクリルアミドー尿素があれての電気体動の位、オリゴを軽減多が(BF)光を用いて可提供させた。 BMA*5ンドをゲルから切り出し、そして 1 m 010cm の りりょ 2 m 31、 pH 7.4、500m 20 m 1、E m 000TAの中で配定でで2 時間がけて溶費させた。 最終情報は、 BMA 5 C 1、E m 000TAの中で配定で2 時間がけて溶費させた。 最終情報は、 BMA 5 C 1 t 1 ブを砂がのメタノールで序刻させることによって行った。その治療の体験を約50m 1に下げ、そして 13.4 的成立250m 2005;;) での光学高度を測定することにより決定した。

即张供太消化

制度酵素消化は全て、Bettesda Research Laboratories (Gaitherstorg, MD).

PAG ポリアクリルアミドゲル

FACE ポリアクリルアミドゲル電気接着

FFS リン酸級耐食塩水

PCk ポリメラーゼ連続反応

pSCFF SCFFをコードする DNA配列を合むプラスミド

B10S ラジオイムノガイド外科

EIT ラジオイムノ治療

scire 一本稿FVイムノグロブリンフラグメントモノマー

goPvs 共有符合した一本鎖N/イムノグコブリンフラグメントダイマー

SDS ドデシル銃設ナトリウム

788 トリス経節合塩水

トリス (トリス (ヒャロキシメチル) アミノメタン)

TOBS ツイーン20衣券設

Va イムノグロブリン電鉛可変ドメイン

V1 イムノゲロブリン軽値可変ドメイン

抗体

<u>CCA9</u>: ヒト陸制関連数タンパク質T2(7AG-72) に特見的なネズミモノクローナル抗体:ATCC No.889459として寄托。

CC19FAB : 重額のN · 宍脇領域に途応している完全軽額より求るYC19の決解結合性領域。

CC49scky: ペプチドリンカーにより走球されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本数抗体フラグメント。

CC197v2 : ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49sc7r。7v の後ろの数字は、表示の分下のセノマーサブニニットの数を思味する。例えば : C49rviに六番体の影響体を意味する。

CTABROPY2: 3つのリンカーにより運動されている、2本の『CLSY』ドメイン と2本のV』ドメインとより成る共有総合第一体配信体フラグメント、V。(L) とV。(II) ドメインとも理動し合わせるのに6つの可能な頃序の組合せがある: 18LE LHRL LHRL ILLE HITLEがMILL

New England Riolaba. Inc. (teverir, MA) 又はBonarianer Manchein (BK. Lei iauspalis. 13)の患者及び促棄液を用い、その報道者の解集する手間に従って実施した。特にさせた生成物をポリアクリルアミドゲル電気系動 (PAGE) により分類させた。そのゲルをエチジのムプロミドで取血し、その DNAペンドを返ま研究により簡明化させ、次にでその BNAペンドを切り出した。そのゲルスライスを、513のトリス、2.5元との作跡、1点の2074。6月 8.0をもび近野チューブ (Exico Carbide Corp., Chicogu) の中に入れ、そ1、て Max Submerianを承求系数 報答 (Not Paga Selectific Instruments, CA) を用いて治証させた。サンプルを報を Speed Yausmell (Sevent Instruments, La) が用いて治証させた。サンプルを報を Speed サンスを表記の(Sevent Instruments, La) が下げた。 (NAAをエタノールは底をサンをして範囲を見り)

軽素結合免疫収集アッセイ(ELISA)

Johnsonら、 Con. Res. . 40. 850-857 (1988)に変数的に記載の通りに調整 した FAG-72飲屋を、ボリビニルクロリド86穴マイクロタイツ・ブレート ①yea tech Laboratories, Inc., Chastilly, FA) のヴェルの上に一夜乾燥させること で被ぎさせた。そのブレートを PBS中の1%の BSAで31℃で)時間ブロックし、 次いで 200ヵ | の PBS。C. 05% ピツィーン50で 5 回走った。25ヵ | の芸藝妖体及 び25g 1のビオチニル化C(49:1/20,000希沢率の ing/mlの名款) モウェルに 加え、そしてそのブレートを3Jでで30分インキュペートした。ブレートに結合し た TAG-72、ビオチニル化GC49、ストレプトアビジンアルカリやスファターゼの 相対量、及び発色時間は、全針な抗体又はビオチエル化CC49がないように、しか もstPvによる報合を検出するのに十分なシグナルが問られるように実験的に決定 した。協党コントロールはSug/alのCOMOROTOug/aloCCMSFab とした。 私セコントロールは PRS中の1%の BSA及び/又はほLDとした。未結合のタンパ ク質を洗い無した。アルカリホスファターゼの複合された1:1000の希釈率のス NOTATES 250 of (Spother Biotechnoley Associates, Icc., Birmingham , AL) を加え、そしてモのブレートを31でで30分インキュベートした。そのブレ ・・トを更に 3 回虎った。50±1 のパラーニトロフェニルーホスフェート答案 (Xit kegoard & Perry Laboratories, iac., Gaitheraburg, MD) を放え、そして発色 反応を最低20分行わせた。 scFr2結合の相対最をマイクロブレートリーダー(Ma Tecetar Devices Corporation, Maple Firk, (4)を用い104 - 470 naでの光学策 度スキャニングにより測定した。 sch2の場合は、発色の高時値でを伴うだまデ エル化CC(4)の結合の低下をもたらした。

SDS-PACB及びウェスタンプロッティング

SDS - PASIC分析のためのマンブル(20g1)を、発展元用サンブル素製パッファーSegrasol 1(Hategrated Separation Systems(185), Matick、PA)の中で3分 ド共済することにより研製し、そして、0-20%均能のボリアクリルアミド Pailt by Biograticその型の変のは物質(185) に従って配せた。

電気効力は、Mini 2ーゲル数数(ISS) を用い、ゲル当り55m(で、一定の電池で 終15分行った。ゲルモケマジーブリリアントプル・R 25つ (Bio-Rac, Rickons) 、CA) の中で少なくたも「時度命也し、次いて戦色した。分子量域性是は予め染 められており(Mid Range Mit. Eiversified Biotech, Menton Centor, MA)、そ して下型のタンパク質を含んでいた:ホスポリラーゼト、ゲルタメートデビドロ ゲナーゼ、オバルブドン、ラクテートデニドコゲナーゼ、以数アンとドラーゼ、 ヨーラクトゲロブリン及びチェクローム C。対応の分子量はそれぞれ85,000、55,000、48,000、38,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュブリケートのグルも体動した。電気体制像、ゲルの:万を選帳パッファーキ 1 (0.3Mのトリスー配)。pil(0.4)の中で15ー20分甲能にした。Issobilon P PNDF (ポリピニリデンジクロリン) 数 (Willippere, 3 effort, WA) をノタノー人でそ分型配し、そして水の中に2分類した。その数を次に降低イッファーキ、の中で3分平度にした。2illiblot=SDE 装置(Willippere, 3)を、ゲルの中のクンパク質をこの数に低写するために対いた。一滴の関係パッファーキ 1 の中に対し、そしてその電神質の上に持らかに置いた。保護パッファーキ 2 (25mkの・リス、別10.4) の中に受した別の組織を一枚目の上に取せた。次に満れた「NDD製造の主、平衡ゲルをその上に乗せ、そしてお数に能味パッファー (40mkのグリシン中の発調のトリス形1、回24)の中に対したは進転のシートを加えることによってナンドイッチを作った。転ばは250mkの定案電道(初期電子は8~20ポルトに類配した)を用いて30分でを使られた。

应者のプロトコールに従ったが、ただし落着バッファ・・として 0.1Mのクエン政ナトリウム、は 3.0を用いた。個分を 1.0MのトリスーRCI pE 9.0を用いて出ーてに中封した。ピオチニル化式がは下配の通りに設定した。 FAID 14:11 ec、水の中で 100 u 1)を 100 u 1 の 0.1MのSa₂CO₂ pH 9.6と反合した。ピオチニル e・・アミノーカプロン酸ドーヒピロキシスクシニミドエステル (Biotia・XーWXS) (Calibiochea LaJella, Ca) (2.5mc) を 0.5mlのジノチルスルホキシドの口に除かした。Bictia・XーWXS 溶液 (20 u 1)を PAID 146歳に加え、そして20でく時間反応3 せた。過剰のドオチン及び不動物を、Flarmacia Apperoxa 12 WXIO/3Cカラム (Piccalaway, XI)を用いてが水湯温により換えした。 0.8 u 1 / mim の度速で、ビオチェル化 FAID 14は 16.5micのビークで清洗した。このピークを構成する両分をプールし、そして4℃で保存し、そして CC49v。及び Vu CM により表定されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

等電点(pl)は、MASTAZ(Madison、Mi)を介して大手できる PROTEIN-THTM でおいう名のコンピュータープログラムを用いて他定した。人力してある配列に よるアミノ酸低点に乗づる、Miに加えて場解が得られた。 Cra鉄塞は電荷に寄与 するため、 Cyskでいての計数はCに調整し、AVIならそわらは全てジスルフィ ド統合に関するからである。

実験的にplを、laggelアガロース IEFプレート、IB域 3 ~10 (FXC31 p) products. Rockiand、 IED を定いて決定した。Biorad Biorphoresis 水平電気泳動をかる、IEF を行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動像をは、 500でかト (原界)、200aの電流反び10Wの定案電力とした。等電点泳動は 900ainで元プルた。 IEFを座品はBioradより購入した。そのネットはフィコシアニン、ターケットグロプリンB、中央数プンヒドラーゼ、ニト状数アンヒドラーゼ、馬によグロビンとトへモグロビンA及びで、3 レンチルレクチン及びチトクロームCを含み、それとの91位は1.65、5.10、6.00、6.50、7.00、7.10及び7.50、7.80、8.00 びびに8.20及び9.59である。ゲルを、 PXにより供給された仕録書に従って染色及び成とした。

CC48抗体神の定量

フェットした後、その頃を木の中で物学にすすぎ、そして20mlのプロッキング 治療(トリス硬新食様を(TDS) 中の1%の生血治アルブミン(BSA)(Sigma, St. Le uis、MD): を有する回の中に入れた。785 はPierce Themical (Rockford, IL)よ り、子福祥寺を来たして購入し、500mlの水を加えたとき、その復合物は25m以のトリス、0.15Mの塩化ナトリウム治液、pi T.6を供する。これらの資を毎少田 I 時費、周囲温度でブロックし、そして20mlづつの 0.5Mのツイーン20洗浄産(TT 188)を用いて5分割を回路った。1100を要なするには、0.5ml のツイーン20活動 のようを T35のリッケー当り提合した。使用したプローブ技術は20mlのビオチニル 化 5kiD 14本現とした(10m 2 / 20mlの状体パッファー)。技術パッファーは 1 QualのT185当り1 gの BSAを加えることにより作った。例用品度で30~60分プローブした後、その頃を上配の通り7155で3回点った。

次に、その課を利用値便において30~00分、次にパッファーの中で1:500 常 気敵のアルカリホスファケーゼの私合されたストレプトアビジン(Soutters Fie technology Associates、Birgington、41) 20el とインキュベートした。食舟工 程を上記の通り、この機構り返した。発色反応の初に、壁を炭酸アルカリパッファー(20m1) 20中で2分使った。このパッファーは 3.1Mの炭酸水果+トリウム 、1 減力 30cll。14.0、pt.0 3とした。アルカリホスファケーゼにとっての登費を 行るため、ニトロブルーチトラブリウム (1831) クロド (Sorga、Signa) を70%の ジメチルホルムアミドの中に溶かした。5・プロモーオークロロー3・インドのイ ルホスフェート(801P)(25cg、Signa)を別に 100%のジメチルホルムアミドのイ に応かした。5・プロモーオークロロー3 ーインドルホスフェート(301P) 225 ms、Signa)を別に 100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの解験 と、Procetaよりウェスタン文を色刺として市販されている。次色のため、それを 11 120g 1 を上記のアルカリ治波に加え、そして15分別反応させ、次いで食色製からそれらを水で洗い流した。

ピオチニル化 PAIE 14

FAI) 14は、CC49に対して特更的な、ATCE Mo.CRI40256として奇託されている ネズミの原ーイディオタイプ原体(LeS2a. Kアイソタイプ) である。 FAID 14を Bygene Protein Aアフィニティーカラム(Yonkers, NY) を用いて無数した。製

183、scFVの0種主よび甲重体にPVを含む精製CC4S的体はすべて、身合している 1.0cmが路長の石支製キュベット(Hollmath)および Porkin-Bime: HY/THS 分 先光度計算32級を用いて、タンパク質指収検の 280mm施長光の東光度を調定して 定載した。それ吸光系数(B。)は、各抗体について、下紀式を用いて質定した

E = = (Trp数) ×5.500 + (Tyr数) ×1.540 - ((C)s) 2 2 ×150 - (Par数) ×10

これらの信は、5.5. Patiacier、Aivances in Protein Chemistry, 17後、 375 ~ 278 日に記載されている情報に基づいている。

高性乾液体クロマトグラフィー

CEMPSCFY2を権利するために行った高性総決体プロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまた13チフロン製配管を用いた LER DPLC システムを使用した。このシステムは、2150型MPLCボンブ、2152型を創設。 CTOmnの母光度に設定された UV CORE SI 2938 製造出版圏および2211型 EmperRac Fraction collectorで構成されている。

サブユニットの PCRによる製造

ボリノウーゼ連載反応(PCR) はすべて、 ISOとコグラム (pt) のプラスミド移
の) (pSCFFURI) ; 103とコモルのプライマー: 1 g 1 o)Ferkin-Rimer-Cetus社 (米国、コネティカット州、ノーウォーク所定の FCC社) の Ambli-Tagまサノウーゼ: ボットの 10ml 4PTでおよび10g 上の10x 砂密板 (両者ともに PECチットに提 飲されている) : ならびに合計事権を 100g 上にするのに充分な木で構成された 反応連合物で行った。 PCR反応はノーカーが定型しているのとほとんど同様にし で行った。これらの反応は、PRC SGOのサリーモサイクラー(thermoveler)を用い で36サイクを行ったが、その1サイクルは、QVCで20~43時間の DYAの存住: 52 ~66でで 0.5~ 1.5分間のアニーリングおよび12でで 0.5~ 2.0分間の存在では 成されている。オリゴスクレオテドのブライマーは、Amplied Bioxystema社 (未 用、カリフィルニア州、オスター・シティ所存)の330A収もしくは SGI型 PAA会 成者で合成し次いで上記のようにして非転した。

リゲーション

形質斯袋

形質転換は、 100以上のStretagene社の大器圏 (E.co.1) AG コンピテント間 物(米国、カリフェルニア州、ラ・ホーヤ所在のStretagene社)を用い、メーカーの指列によって行った。上記リゲーション反応物由来の開入(1~5 ェ1)を使 関した。形質収養ステップの後、細胞は、減合を続けながらかりアプロス(LB) 中で3Tでで1時間再生させ、使いて、 pSCFVTIB、 p45LTLBもしくは 243LTIB.に月 いる20以来が配のクロラムフェニコール合有(CARZEO) かりを展天上にプレートし またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由未のその後の構 発動に用いる (004 女/エアンピシリン(MP)(AC)かリア巻天プレート(LR・ARP) 00)上にプレートした。

大肥肉クローンのスクリーニング

細胞プラスミドは、Prometa社(米国、ウィスコンシン湖、マディソン所在)の Waginミニーブレッププラスミド製造チットを用いて、匈太王(selection pressure)を並持するため連切な専邦を含有するLRプロス州各物からは難した。このキットはメーカーの取扱い説明者にしたがって使用した。

プラスミドの精発

piftELLEUs が piftELLと命名された3種のブラスミドを、多館の一本鉄杵体を返還するために構築した。 piftELLを含有する電主構設は、 V. -L-V, -L-V, -L-V, で表すことができるボリベブテドを確立した。ここで V. と V. i3CCCGM 体の経験と真認の研究疾棄であり、およびリンカー(L) は、ド記 SEQ 18 80:5 の配列を有する25種のブミノ酸のリンカーである。

lee-Set Ala Asp Asp Ala Lys Lys-Ast-Ala-Ala-Lys Lys Asp-Asp-Ala-Lya-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

g49LEBLを含有する宿土組動は、 V. -1.-Ve -1.-Ve -1.-Ve で表すことができる

ました。極色プローブであり、かつBeall および Miel による消化物由来の 207 他の基盤対視人所片(他のに示す「958~2165の塩基対視(bp))を含有するクローンを953301T とあ名し、次いで649V間に対するテクレナチド配利を含有するe51301 町を構築するのに選択した。 8hell・Basil pen/ターミスーターを951301中に係置した酸由は、その Xtel とbeall I の係故の間のポリリンカー領域中に存在する 2017回劇限エンドファレデーで係近を除くためであった。このことは、 8ee47回動度エンドスタレアーで係近を除くためであった。このことは、 8ee47回動度エンドスタレアーで係近を除くためであった。このことは、 8ee47回動度エンドスタレアーで係近を除くためであった。このことは、 8ee47回動度があるV 、 2. V。の環境を使いて構造するため設計された。 8 V 保護が 8ee47回 、 2. Xb に 8 位に付知されると、 8ce47回の各種を対した。

V, 配列は、PCR性色の壁的として pSLF7 JANを用い、オリゴの5 * SCF.と 5 * オリゴの5CPSによって FCSで作製した。SCP1に対するDNA 配列(SE0 JU NO: ju) とSCでに対する DNA配列(SE0 ju No: ju) は次のとおりである。

SCP1 : 5" -TAMA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3"

SCP5:5' -TANA <u>OCT ACC</u> ACCA <u>ACC OCT</u> TAU TGA CGA GAC CCT CAC TGA GCT-3' 下数をつけた部分はエンドネクレナー「制度感位を示す。

増組された Va DNA を、4 Xの PMG、飛気浴台、エタノールによる法費および 20ヵ L 水への溶解によって噴敷した。そのVa 配列を Xto I と Rhe I の質量放棄 で消化し、同じ形底酵素で消化され残いて精製された pSL3017ペッターに対するインサートとして思いた。喧楽のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4 ヵ L) を用いてコンピテント人野電級1 細胞を形質転換させた。形質転換された類似を、 LB AMP107過天プレート上にプレートした。 CC49%。インサートを合育していることを示す感情的クローンを RDe I および Inc I 消化スクリーンから取出した。

United States biochemical (BSB) 社 (米国、オハイオ州クリーブランド所在) のSequence Bit、および配列決定用プライマーBSL3015606 (pSL301ベクター中、Tho I 印位から571)上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー) とCC4598Fを用いて、961 の配列決定を行って、CC4598を用いて、961 の配列決定を行って、CC4598 の配列を報送し、pSL301 出て中に乏しい LC4698 配列を報送し、pSL301

ポリペプチドモ産生した。こ、でV、とV。はCC46数体の対象と重弧の可変観響であり、およびしは上記アミノ死を列を有するペプチドリンカーである。

CC49V: L.V: -1-V: -1 V: (p4913LH) のフクレオチド配列(SE4 12 VO: b) とアミノ政紀列(SE4 ID NO: 7) を図るに示す。 (E49V: -1 V: L-V: -1-V: (p49LHH1)のメクレオチド配列(SE4 ID VO: 8) おこびアミノ酸正列(SE4 ID VO: 9) を図るに示す。

rSL301||Tの得要

pst.201所の終めを図8に示す。パシラス・リヘニフォルミス(Batillus lichtus licotris)のペニンリトーゼド(pmar) テーミネ・ターの配列を、 3kc l むよびBa 明1 で45分間満化することによって、 pSCFV [70/ご在名されたプラスミドから攻出し、電気体動を行った株 4.5%ポリアクリルアミドゲルから切取り、単気冷却させ、スタノールで収録させ、次に、同様に製造されたベクター: pst.2311 (米回 カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogath) 中の同じ部位に連絡した。 pSCFV [70]の製造手限は、1900年8月21日付け出放の米国保存環境の7/50%のCCG 号に配載されている。たおこの出版の開示率項目本限に兼理するものである。 液に、 pSCFV [70]に、penPプロモーターのスクレオチド配列: 四方 Neo I 列段和位: CC497。類は、Bindの制度形位: 25位のアミノ絵のリンカー: 四方 1版内部位: CC497。類は、Bindの副標準位: pct/ターミネーター;およびEash 1 が開始組位: CC497。類は、Bindの副標準位: pct/ターミネーター;およびEash 1 が開始組合を含むしている(図8 参照)。このpcm/プロモーターとpcm/フェミネーターは、Berssio、 1 Binl. Chem. 250番、 1211-11213 頁、1980年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3 μ L) を、LB・AMPL DJ 参東ステレート上に ブンートしないで、皮味噌させたコンピテント大原側AG1 報程を形質を数するの に用いた。pcafターミネーター、インサートを含有するボテンシャルクローンを 、 Fibarmacia社(米型、メリーランド州、ガイサーズバーグ所在)の TI Quicky riset ***! DMA型資本サー)と、Bulavelsら、Sucleic Acid Research 17巻、 452 夏、1989年に記載されているマイクロ数によるコロニーの解決をともに用いてス クリーニングした。ブローブは、pcafe - Amel - Bamil 1 ターミネーターフラグメ ント台体であるが、Quickprimeキットによって促進された技術によって配着し使

p5130i - TBL7およびp5L301 · FLITの両尖を選挙するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをことに示す。

pSL3015E2R(5EQ ID No: 12) および CC49Y。(56Q ID NO: 13) のオリゴメタン オチド尼引は次のとおりである。

PSESSESSES : 5' YES TEC GAT THE CON ACC TTA 3'

COLOWRP : 5' -GAT GAT TIT AAA TAC AAT GAG S'

実施列1 つ4月(州田) の構築

pSi30iHT(5 μg)を出産物質として用い、これを Ren47世および Melで流化し、大きい万のベクターフラクメントを開製した。 CC49Vn 押入ソラグメントは、5*オリゴとして SCPGCを用いかつ3*オリゴとしてSCP5を用い、 PCIによって製造した。 SCPGBのヌクレオチド配列(SQ) 13 VD:14) は下記のとおうである。

SCIPES: 5" - FRAN TICK CAN GAT GAG GOT AND ANA DAY UTT GAG GIT CAG TTG CAG CAG TITLE".

またポリゴ SCPCBはリンカーのコーディング発表の一部(SEO)に 80:1401966 ~76) を含有している。 pSCFY (WH中のCC4973便的でアニールするよう取件された技术リゴの部分は、 SEO 18 80:14中の5077~00由来のちのである。

下脚をつけた配列は Fsp I 報生に相当する。得られた PCRインサートを開業し、 Fsp I と Nie I で点化したいでpSC301HT ScotTH - Nie I ベクターとのリゲーション反応的 (8 y L) で形質技術を行うのに用いた (図 7)。コンピゲント大幅圏が1 利家を、このリゲーション反応的 (8 y L) で形質技術を行うのに用い、は一種PIOC為天プレート 上にプレートした。pSC301HT 生成物を示す正しい大きさの Ibe I - Nie I インサートを育する 2 個のクローンの配列をオリゴ5071を用いて決定し、上しい配列(図 7のスクレオ・ア 71(24~1543) を育する単クローンをその後の構造に用いるのに進んだ。SCTのスクレオ・チド配約553 10 Ni : 150 は下記のとおりである。

SQP1: 5" -TO ACT THA TOT AND ATG ATG T-3 "

厳終のリンカード、サジュニット(bn1544~1665、例7)は、5 * オリゴの S CP7bと 3 * オリゴの SCP8aを用いかつ PCRの物所として pSCFF DRMを用いて配泊 した。 SCPTEのメクレオザ FRERVISER ID NO: 1<u>6</u>) は FREのとおりてある。 SCPTE: S1 -TAMA TEE GEA GAT GAE GEA AND AND GAE GEA BUT ANA ANA GAE GAT GGC ANA ANG GAT GAE GGC AND ANA GAT GTT CAE ATT GTC ATG TEA GAG TUT GC

Ti動をつけたメクレオチドは Faul 部位である。 5078aのスクレオチド配列(8-80 (1) Mil: 17) は下記のとおりである。

SUPRE: 5' -TANA GET AGE TIT TTA CTT AND CAC

CAG CTT GGY CCC-3"

下載をつけた最初の「値は Nho 1 配位に相当し、もう一つの種は Af1 J 保貸に相当する。 SCPT0のヌクレオサドミー76はリンカーモコードし (図すのヌクレオサドミ-154(~16:2)、一方が、にアニールするヌクレオサド??~93は図1の16:2~16:35に集中する。プライマー SCPRatは、その37 米的の塩かいナール、 Nho I 関係配位、技企コドン、Af1 II 制限係位およびり、の最後の2: 数の成かいナール、 Nho I 同係配位、技企コドン、Af1 II 制限係位およびり、の最後の2: 数の成果を合有している。 Fas I と Nho I による指化の後、この保られた 42933のインテートを再製して特別は543(1880)でメラーの Nho I と Eco47回の保証に連結し、機構的なプローンを Nbc I と 160 I でスクリーニングし、近しい人含含のインサートが経過されたの458(12)(一)と5297を配列が検定されて、pSL001間に中に終たに挿入された配列が構造された。そのヌクレオチド配列は580(18 80: 18) に下記のとおりでよる。

49LFR2 (-) : 5' -CTG CTG GTA CCA GGG CAA G-9'

プラスミドッジ 2018日にする Tho 1 および The I で海化し、結裂し、持られた175 トゥ V。・リンカー・Vェーリンカー・V・セグノンドを pSCFV EMRに連結して 5 49LBHLを監撃した。なおこの pSCFV EMRは同じ同居財産では所られその大まい方のフラグメントを特別したものである。そのリケーションズの生成物(4 2 1 后分)を用いてコンピテント大勝勝所1 報題(Straigerst)を形質転換し、LBCA型C 寛大プレートにプレートした。正しい関係酵素地型を育するプラス:*を含有する単クローンを、p49LIIILを含有させるために選択した。 p49LIRLは、CC49 多価一本銀技体 ac/v2: V。-L-V。-L-V。-L-V。-L-V。またにCC49seFv2(LEAU)のFeePプロモーターとスクレモディを取り合き者している。

りは次のスチップで格正され、オリゴSCMGC(SEO 10 60: 21)の末地に5塩残の 欠無を組込むことにによってpSL301RLHで製造した。

SCF60: 5' -TAAGERETSATGATGCTAAGAAGGACGCCGCAAAAAA

GCACGACGCAAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTGG

AGGTTCASTTGCASCACTCTGAC-8"

SCP8C中の下離をつけた配列は Eco47可忽放に組当する。 PSはたおいて、 SCF 6Cは5 * オリコとして可いられー方 SCPIGは3 * オリゴとして用いられて、リン カー CCC49: セグメントが生成する。SCFIG のメクレオチド配列(SRG ID NO: 22) はごよのとおりである。

SUPPLY: 5' -THE THE TAG CTT TTT ATG AGG AGA GGG THA

SCP10中心下値をつけた配列は図6のメクシオチド1958~1883に見られる Nbe I 印位に報当する。この場合、PCRインヤートは Nbe I だけで博仁されないで精製される。ベクター(pSL301HLT) は Ecc47担節は (先に形成されている) および Nbe I 那位で前化されないで精製された。そのインサートとベクターは定転され、その一部分 (3 m l l) 多低ってコンピテント イー・コリル I 開始を形質転換した。この事質転換機関をLB-AMPLOCプレート上にプレートし次いで検索的タローンを 1 ho I と Nbe I でスクリーニングした。正しい大力さの DMAを育する 3 毎のクローンを得た。これらのクローンのうちの 2 母は、オリブ49VLCDR3 (ー) ジェび50Plを走いて配列を設定した。そのクローンを写て (49VLCDR3 (ー) の F W I I F No I E No

49VLCDR3 (1) : 5' CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1553 ~1863からの配列が確認され、近しいpSL30[#LRL/フローンを示した。

大慶彦中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLEを製造するため に、p8130LHLE「(5 μg)を Nbr [と lbo] で消化し、次いで Vm -1-Vc -1-Vc 配利を含有する小さい方のインサートを補勤した。この軟片を、DSCFV UIB(5 μ g)を lbo] と Nbe] で消化して神た大きい方のベクターフラグメントの前数数 と連充した。上記退転数合物の一郎(4 μ L)を使ってコンドナント大勝衛AG i 夹充例 2: p49LILLIO磷钨

o49LILI.Rの機能を図<u>10</u>に図式的に示す。リンカーV、のチブユニットをうった りごの SCPTAと3~オリブのSCP9で製造した。

SEP9: 5' -TAN AGE THE CHE CAN GEE STT ACT ITS

AGC AGC AGC TTG GTC CCA G 3'

SC?Tbオリゴ (スクレオチドさ〜Te) は図6のリンカーをコードし (ヌクレオナド1124〜1192に相当する) および図6のV、のフクレスでで1193〜1215に都当する。PCSに対する pSCSV CEN環境 (ヌクレオナド77〜39) にアニールした。

SUP9は、Nec1部位(第一のド母をつけたアクレオナド)と FCG/TJ希位(第二の下級を付けたヌクレオチド)を有し、これらの配位は次のV 領域を受けるための 261.301組工を作るのに必要な解除薬位である。SCP9のヌクレオチド18~24年間 6のスクレオチド1852~1557(リンカーの最初の2組のブミノ路をコードしている)に相当し、一方アクレオチド2(~46は、PERにおけるSCPE(SEO IP 30 : 19)のフニ・リング係域である図号に示すヌクレオチド1508~1551に相当する。プラスミドpSL301所を Budf型と Me I で消化し、もしてもの大きい方のベクターフラグノントは特別して、予め Fsp I と Wis I で発出され特別された、PCEからのリンカー CC40%、PMA インサートと連続させる。その連結ば合物(3 以 1、2 年間の大きなのフラグメントを有する一つのコロニーの影響をデリコ YEEFISEC を用いて決定のフラグメントを有する一つのコロニーの影響をデリカ YEEFISEC を用いて決定した。そのヌクレオチドを対信SCP(IC MI : 27)は「F記のとをりてある

5' ITG ATC ACC AAG TEA CTT TAC G 3'

配列決定の結構は、終られたp31302町クローン中に P2Rの脚よりた欠失があるということを示した。図6にみられるメクレミナド1533~1537に相当する5億の地差の欠失がみとめられ、そして下であるべきはずのメクレオチド1531は DXAE 持のデータから保証したところ実際にはGであった、得られた配列は、

5' "GAAGGGGTT "TA > E.

こって下級をつけた配列は偶然に GoofT回席位を形成した。図 8 のACCECTの配列 はソクレオテド1530, 1531, 1522, 1528, 1539および1549に担当する。このボタ

関節を必須販支した。項られた形質能は混合物をは一CA的20 ブレート上にプレートし、次いて MOLEMEに対する代表的なクローンを、正しい制発酵素地図(図10 参順)および TAG 72に対する主動活性に基づいて遅失した。

実施所 3 CC49 aprv2のLHLHとURLが共有統合した「皇体の特別

CC48の共有結合した一本独二量体(scPv2) の結製を行うために、大股町のペリ プラズマ経治質の自分を、 p4JLILIEと p191.取Lの内台の 1.01 の一代合書物から 翻載した。姿勢すると、始重物を 2ECmLづつの 4部分に分割し、Sorvall GS 8 ロータで10分間 5000ヶ地で退心分離した。ベレット化した細粒を洗浄し、 30歳 MaClを含有する10m2トリスーIC)pH 7.3からなる 100元中に再島耐させた。旺飽 を再びペンット化し、合計 100mLのS@mVトリス~MC! p3.S で洗浄し、そして一つ のチューブにブールした。このチューブに、40女/ャ%のスクロースを含有する 30mMトリスー3Cl pH 7.3(100mL) および16mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を抵加した。 得られた混合物を、時々振遠しながら、空道に10分間発行した。英張性知能 は5 pertonic cell)を前記のようにしてペシット化した。次のステップでショックを 与えて、はベレットを20mlの水浴 O.fask Mattl;中に速やかに悪菌させ、次いで時 タは特にながら外上に10分間保持した。その無償を貸記のようにしてペレット化 し、大路菌の考辺細胞質の自分を包有する上海を築を、 0.2μmの Nalge社(本 国。ニューコーク州、ロチェスター所在)の遺迹装置で超過することによって含 らに清査にし、次いでAnicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンパース所在) のCentriors 30およびCentricon 30で 1.0mlより小さい容積をで表稿した。

p/01HL3または p(01HLのクローン由来の表籍周辺協助質のジェケート (than bate) を、 Pharancia社 (米田、ニュージャージー州、ビスカチワニイ所充) の Superder 75 H3 13 /90 BFLC カラム (子め P38で平衡化させたもの) には入した。 独合 BLISA社で利定する場合、開発の主義的は 0.531/分の返量で21ー24分 断波出させた。 活性耐分をブールし、先に述べたようにして連続し、次に、システム500 Bierodialyser Unix (Pierce Chemical H3) を用い、提到液を3~4回底 たながら8000mmカットオフ度を世界して、20mmトリス-BC1 の6 7.6に至して一夜 近年を行った。その試料を Pharancia社の#032 3 H3 5 / 5 アニオン交換即LCか ラムに注射した。 環報液入として20mmトリス-BC1 24 7.6を用い、提到液のとし

て20Mトリス-RCI pH 7.6+C.5M AcCI をおいる勾配プログラムを、 1.5al/mi a の途島で使用した。間面の主が物は、製合 3LISA法で列だする場合、名々3~4分割かり入から放出させた。この時点の両分の、こつの SDS・PACEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリリアントブルー3250で吹色し、他力のゲルはクロスタン分析(プローブ気体としてピオチェル化 PAID 財を使用)に移きれたが、sch/2(LRLHをたはLRDL)の使の計算分子量の中・バンドが、56.239ダルトンの位置に出現した。活性通分は各場合権权し、 50組 483 pH 5.8に対して一次透析し、次いて Phatmacis社のNase S IN ミノ5カチオン交換カテムに注射した。この特別人ディブからの開発のこつの面分のうともは、SDS IAG はおよび ILISA法で制定する場合、気配料の表示が開始される運動に設出された。 したがってこれらの関分は実際にはカラムに組合していたかったわけである。次いで重分とそはよるに概要するためにブールした。

None Qカラムを居住Mine S配分について再変使用したが使用した原業額は20ml トリス・HCI pid 8.0であり、混盘は 0.5ml/分に低するせた。生成物はカラムと の結合なして放出されたが、None Sに扱っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は対策であり収扱の特殊技力のために対議した。

李宪点看包体勤

旅事物の奪取点(pi)は DTASTAt社(米酸)ウィスコンシン州、マディソン所 在)のコンピュータソロケラム Protein-Litterinを使用して予測した。アミノ撃 様式、場およびpi単に基づいて計算した。

| 試験では、olは、PRC Bioprofects社(米国、メーン州、ロックランド所在)
の bankel (EPプレートの監開3~10を使用して削定した。上記 (EFを支持するためた、Biorac社 (米国、カリフォルニア州、リッチキンド所在) の電気成動製品を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気が動の条件は、20mAで 500V (限定) および一定電力の10Vであった。毎項点電気が動は90分割で完了した。Biorac社の (EPを製造して) フィコシアニン、タラクトグロブリンと、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンとドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3 値のヒラマメンクチンおよびシトクロム

機能的な抗原結合部分をもっていることを示している。これは、単量体の機に比。 ペマや Isoについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、 xcfiv2分子が、その CCrSixの数と回事に、免疫役所 用途の候補であり、毛磁血管透過性の導大および一層洗液な毛体分布薬物動像の 利点を有することを示している。この利点によって、既存の 120分子に比べて、 本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ場合標に用いる免疫症療法に おいて確窮:相様比を高くすることができる。

本受明の他の実施監告は、本別報告を検討するかまたは本願に関示されている 発明を実施することから、自成技術分野の当業者にとって明らかになるであうう 。本明報者と実践外は何点だけを目的とするもので、本発明の第の進用報酬と思 を対しての構束の証明によって示される。

以上

じかさ有され、別値はそれぞれ1.35、5.10、6.00、6.50、7.00、7.00、7.00、7.8 €.0 0、9.20 および 5.6であった。ゲルは PMCの把示にしたがって変色し軽色した。 DXASTAR プログラムによって両方の xzfv2の種の別節として 9.1の値が手測された。 た、戦品の生成物に対し単一の当一なパンドがゲルトに、両者の別値の 6.9の位 家にみとめられた。

igG, actv2(LELEおよびLHIL)のような特徴の19元本は、 280mm接長光の参先 更を分光文学的に研究することによって定量した。モル吸光係数値と、は名々、 先に引用した Wellawicrの式を用いて制定した。

そのアミノ数組成に基づいて、00491x6、0049x67v213tll 0049 xcfv213tll たいか xcfCC49xcfvのモニュニ (280nm) 値はそれぞれ 1,49, 1,65, 1,65 および1.71であった。

実施例 4

CC49scTv2の確のLELBとLEMLの相対訴訟法を、「gGおよびCUUD未続にFL4Gペプチ ドを行する甲基体scFv型と比較した。

パーセント競合(perceal goopetition) を下記式によって Eliskのデークから 求めた。

```
ゼロ競合 試料が取り値 (OD 405-45Cnm) × 100
```

***コロ競合(sero competition) 値は、1 例 854をピオチニル化CC49 (8×10 ~14モル) と1:1 注単で現合して創定し、一方 130条数合額はマオチニル化 C C401就と語合した Cci01就の5 μ g / 利試料に基づいた値である。これらのデータは区11に示す。試得の吸光更信は 405m~ 450mで創定した。3 型の映取り始の平均額を使用した。動詞に試得 (25 μ L) を、1AG 一72でコートしたマイタロリットエフレートに、1.0×10.10 ニルの結合部位/重に整率した。ピオチニル化CC40 (4 μ g / μ l) 1:20 000に希釈、25 μ l 使用) で試料を1 / 2 点数に特釈した。 遅続を明法(1:2) 至行った。両方の必要の scfv2は igCに持い等しい(図11参照)。別の試験で、CC45 g C アルカウチグノントと比較した。 図をは一般であるが、これらは TAG 一72に対する結合アフィニチューが鳴しいことを求した。これらの指数は、共有結合の工具体の両者の形象は、二つの充分に

雑式の紅顔

1. 2本以上の一本級法はフラグナン、も含んで成り、各フラグナントが広見に対する税和性を有しており、ここでそのフラグナン・は第一のペプチドリンカーを介して共有を含されており、この第一のペプケドリンカーが下記のアミノなお料

Lou Ser Ala Asp Asp Ala Lyg Lys Asp Ala Ala Lyg Lyz Asp Asp Ala Lys Lyz Asp Asp Ala Lys Lyz Asp Lou

を有し、

そして各フラグメントは:

- (a)経験可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (も)重数可変ドメインを含んで成る剤(ポリペプチド)及び
- (c) この第一と第二の乗りペプチドを検託的な結合性成分へと適応すしめる 第三のペプチドリンカー:

を含んで成る、多銭の一本編託体。

2. 前近経験可能領域が下記の配列

Asp I'e val Mat Ser Cin Ser Pro Ser Eer Leu Pro Val Ser Val Cly Glu Lys Val The Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gin Ser Leu Leu Tyr Ser Cly Asn Gln Lys Asn 7yr Leu Ala Frp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr frp Ala Ser Ala arq Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phu Thr Gly Ser Gly Ger Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Fyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

と変質的に周じアミノ転記列を有しており、そして前配移語可遊び駆が下記の配 列

Giu val din teu Cln Glo Ser Asp Ala Giu Leu Val tya Fro Gly Ale Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ebe Thr Aop Bia Ala Ile Bis Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gho Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Ann Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Aig Phe Lys Gly Lys Ala Thi Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser The Ala Tyr Val Gla Leu Asn Ser Leu Thi Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Dhe Cyo Thr Arg Ser Leu Asn Het Ala Tyr Grp Cly Gln Gly Thr Ser Val Thi Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸血剤を有している。請求項:配収の多世の一本額抗体。

- 8. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ政紀列を有する、請求限:記載の多価の一本額点体。
- 4. 多価の一次値点はキュードする DMR配列であって、この多種の一本質点は が2.本以上の一定性気はフラグノントを含んで成り、各フラブノントが充気に対 する動和性を育しており、ここでそれらのフラグメントはギーのペプチドリンカ ーを介して共有結合されており、そして各フラグメントは:
- (1)軽似可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可数ドメインを合んで成る第二ポリペプチド:及び
- (c) この資ーと第三のポリペプチドを製能的な結合性成分へと遺程せしわる 第三のペプチドリンカー;

を含んで成る、 DM配列。

E、前記第一ポリペプチドをコードする起列が下記の配列:

GAC ATT GRO ATG TCA CAG TCT CUA TCC TCC CTA CGT GGT TCA
GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTC AGG TGC AAG TCC AGT CAG
GTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GGC TGG
GCA TAC GAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTC CTG ATT TAC
GCA TCC GCA ACG CAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC AGA GGC
AGT GGA TCT GGG ACA CAC TTC ACT CTC TCC ATC AGG AGT GTC
AAG ACT GAA GAC CTG GCA CTT TAT TAC TGT CAG CAG TTA TAC
AAG CTTA CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG
CTG
AAG

と実質的に同じてあり、もして前見禁ニホリペプチドをコードする圧射が下記の 配列: GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAG GCT GAG TTG GTG AAA CCT
GGG GCT TCA CTG AAG ATT TCC TGG GAG GCT TCT GGC TAC ACC
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CAT
CAC CGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT
CAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GCC AAG GCC ACA CTG
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCC TAC GTG CAG CTC AAC
AGC CTG ACA TAT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TCT ACA AGA
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GCT CAA GGA ACC TCA GTC
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GCT CAA GGA ACC TCA
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GCT CAA GGA ACC TCA
TCC CTC TCA

と支質的に関じてある、結束項を記載の DAREM。